

Deutsches Herzzentrum Berlin

Klinik für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler

(Leiter Prof. Dr. Peter E. Lange)

DISSERTATION

**Evaluation des neuroprotektiven Effektes
von Methylprednisolon bei
cardiopulmonalem Bypass und
Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Stephan Nicolas Schubert

aus Bremen, Deutschland

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. PD Dr. med. H. Abdul-Khaliq

2. PD Dr. med. C. Bühner

3. PD Dr. med. S. Voigt

Datum der Promotion: 26.09.2003

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Zerebrale Komplikationen in der Kinderherzchirurgie.....	1
1.2 Geschichte der Kinderherzchirurgie.....	2
1.3 Pathomechanismus der Hirnschädigung	3
1.3.1 Der Einfluss embolischer Komplikationen	3
1.3.2 Veränderungen der zerebralen Perfusion und Oxygenation	3
1.3.3 Immunologische Veränderungen	4
1.3.4 Metabolische Veränderungen.....	5
1.3.5 Einfluss der Hypothermie.....	6
1.3.6 Ursachen einer zerebralen Schädigung (Zusammenfassung).....	8
1.3.7 Antikoagulation.....	8
1.3.8 Hämodilution.....	9
1.4 Tierexperimentelle Studien	9
1.4.1 Morphologische Evaluation des Gehirns	11
1.4.2 Nekrose.....	12
1.4.3 Apoptose.....	12
1.5 Untersuchung einer neuroprotektiven Strategie.....	14
1.5.1 Klinische und experimentelle Anwendung der Steroide.....	15
1.5.2 Wirkungsmechanismus Steroide	16
2 Herleitung der Aufgabenstellung.....	19
3 Methodik	21
3.1 Tierexperimentelle Untersuchung.....	21
3.2 Versuchsgruppen	21
3.2.1 Art der Versuchstiere	21
3.2.2 Kontrolltiere	21
3.2.3 Vorbehandlung mit systemischer Methylprednisolongabe	21
3.2.4 Vorbehandlung mit intrathekaler Methylprednisolongabe	22
3.3 Versuchsablauf.....	22
3.3.1 Prämedikation.....	22
3.3.2 Anästhesie und OP-Vorbereitung.....	22
3.3.3 Herz-Lungen-Maschine (HLM)	23
3.3.4 Priming	24
3.3.5 Thorakotomie	24
3.3.6 HLM-Regime	25
3.3.7 Postoperative Phase.....	26
3.3.8 Ende des Versuchs	27
3.4 Morphologische Untersuchung des Gehirns	27
3.4.1 Einbettung	27
3.4.2 Histologische Untersuchung	28
3.4.3 Immunhistochemie for Protein S-100B.....	28
3.4.4 Detektion der Mikroglia mittels Lektin-Färbung.....	29
3.4.5 Quantifizierung der neuronalen Nekrose	29
3.4.6 Detektion der Apoptose mittels spezifischer TUNEL-Färbung.....	30
3.4.7 Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	30

3.5	Molekulargenetische Untersuchung des Gehirns	30
3.6	Statistische Methoden	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Versuchsgruppen	33
4.2	Morphologische Veränderungen im Gehirn	33
4.2.1	Entzündliche Veränderungen	33
4.2.2	Veränderungen der Astrogliazellen	34
4.2.3	Veränderungen der Neuronen im Hippocampus	36
4.2.4	Schädigungsmuster in den anderen Hirnregionen	37
4.3	Einfluss der systemischen und intrathekalen Steroidbehandlung	37
4.3.1	Postoperatives Ödem	37
4.3.2	Zerebrales Ödem	38
4.3.3	Hämodynamische Parameter	39
4.3.4	Veränderungen der Oxygenationswerte	41
4.3.5	Veränderungen des Calciumstoffwechsels	42
4.3.6	Veränderungen des Natrium- und Kaliumstoffwechsels	43
4.3.7	Hyperglykämie	43
4.3.8	Neuronale Nekrose im Hippocampus nach Steroidbehandlung	45
4.3.9	Neuronale Apoptose im Hippocampus nach Steroidbehandlung	47
4.3.10	Neuronale Nekrose im Gyrus cinguli (parietaler Cortex)	50
4.3.11	Neuronale Apoptose im Gyrus cinguli	52
4.3.12	Neuronale Nekrose im Nucleus caudatus	53
4.3.13	Neuronale Nekrose im Kleinhirn	54
4.4	Molekulargenetische Untersuchungen	56
4.4.1	Bestimmungen des Hitze-Schock-Protein 70	56
4.4.2	Bestimmungen der pro-apoptotische Gene Bak und FAS	57
4.4.3	Bestimmungen von Bcl-xl als anti-apoptotisches Protein	58
5	Diskussion	60
5.1	Rolle der Steroide in der Organprotektion	60
5.2	Vergleich der drei Versuchsgruppen	62
5.3	Morphologische Veränderungen des ZNS ohne Steroidbehandlung	63
5.3.1	Veränderungen der Astrogliazellen	64
5.3.2	Neuronale Nekrose	65
5.3.3	Neuronale Apoptose	66
5.4	Einfluss der Behandlung mit Methylprednisolon (MP)	67
5.4.1	Hämodynamische Veränderungen durch die Steroidbehandlung	69
5.4.2	Pulmonaler Effekt der Steroidbehandlung	69
5.4.3	Hyperglykämie durch die Steroidbehandlung	70
5.4.4	Einfluss der Steroidbehandlung auf den Calciumstoffwechsel	71
5.4.5	Ödemprävention durch Steroidbehandlung	72
5.4.6	Neuronale Nekrose nach Steroidbehandlung	73
5.4.7	Neuronalen Apoptose nach Steroidbehandlung	74
5.5	Molekulargenetische Untersuchungen	75
5.5.1	Genexpression des Hitze-Schock-Proteins 70 kDa (HSP 70)	75
5.5.2	Expression apoptotischer Gene (Bak, FAS, Bcl-x _L)	76

5.6 Zusammenfassung der Veränderungen durch die Steroidbehandlung.....	78
5.7 Limitationen	79
Abstract	80
Literatur.....	81
Anhang	95

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Active Clotting time = Gerinnungszeit unter Heparintherapie
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CA	Cornu ammonis des Hippocampus
CPB	Cardio-pulmonaler Bypass
DHCA	Deep hypothermic circulatory arrest (deutsch = KSTH)
EM	Elektronenmikroskopie
GD	Gyrus dentatus
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HSP	Hitze-Schock-Protein
IL	Interleukin
INTRATHEKAL	Applikation direkt in den Liquor cerebrospinalis
KSTH	Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (engl.= DHCA)
MAD	Arterieller Mitteldruck
MP	Methylprednisolon
NO	Stickstoffmonoxid
PO2	Sauerstoffpartialdruck in BGA
PCO2	Kohlendioxidpartialdruck in BGA
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.= Polymerase chain reaction)
SD	Semidünnschnitt
TUNEL	<u>T</u> DT vermitteltes-d- <u>U</u> TP-Biotin- <u>n</u> ick- <u>e</u> nd <u>L</u> abeling
ZVD	Zentralvenöser Druck
ZBF	Zerebraler Blutfluss (engl. CBF)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Pathomechanismus der Hirnschädigung nach Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie und cardiopulmonalem Bypass	8
Abbildung 1-2:	Literaturübersicht der tierexperimentelle Studien.....	10
Abbildung 1-3:	Abfolge der morphologischen Veränderungen von Nekrose und Apoptose.....	13
Abbildung 1-4:	Zellulärer Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide.....	17
Abbildung 3-1:	Anästhesie und Beatmung.....	23
Abbildung 3-2:	Versuchsabbildung mit HLM.....	25
Abbildung 3-3:	Versuchsprotokoll schematisch.....	26
Abbildung 3-4:	Standardisierte Präparation des Gehirns	28
Abbildung 3-5:	Immunenzymatische Färbung des Protein S100B	29
Abbildung 4-1:	Präoperatives Gewicht der eingeschlossenen Tiere	33
Abbildung 4-2:	Mikroglia-Detektion mittel Tomato-Lektin-Färbung	34
Abbildung 4-3:	Perivaskuläres Ödem – Astrozytenfärbung mit Protein S100B	35
Abbildung 4-4:	Perivaskuläres Ödem in der Elektronenmikroskopie	35
Abbildung 4-5:	Astrozytäres Ödem in der Elektronenmikroskopie	35
Abbildung 4-6:	Untersuchte Regionen des Hippocampus	36
Abbildung 4-7:	Postoperative Gewichtszunahme der Versuchsgruppen	38
Abbildung 4-8:	Postoperativer Anteil des Hirngewichtes am Gesamtkörpergewicht.....	39
Abbildung 4-9:	Originaldaten vom 10.07.2000.....	40
Abbildung 4-10:	Hämodynamische Daten	41
Abbildung 4-11:	Arterielle Blutgase	41
Abbildung 4-12:	Calciumwerte im Serum	42
Abbildung 4-13:	Kaliumwerte im Serum	43
Abbildung 4-14:	Glucose im arteriellen Blut	44
Abbildung 4-15:	Glucose im zerebrovenösen Blut (V. jugularis).....	44
Abbildung 4-16:	Nekrose im Hippocampus.....	45
Abbildung 4-17:	Nekrose im CA 1 und CA 4 des Hippocampus	46
Abbildung 4-18:	Nekrose in der Elektronenmikroskopie.....	47
Abbildung 4-19:	Apoptose im Gyrus dentatus (GD) nach Steroidbehandlung.....	48
Abbildung 4-20:	Apoptotische Veränderungen im Gyrus dentatus	48
Abbildung 4-21:	Apoptotische Veränderungen im Gyrus dentatus	49
Abbildung 4-22:	Apoptose des Gyrus dentatus in TUNEL-Färbung	49
Abbildung 4-23:	Apoptose in Semidünnschnitten.....	50
Abbildung 4-24:	Nekrose im Gyrus cinguli (Neocortex).....	51
Abbildung 4-25:	Nekrose im Gyrus cinguli (Neocortex).....	52
Abbildung 4-26:	Nekrose im Nucleus caudatus.....	53
Abbildung 4-27:	Nekrotische Veränderungen im Nucleus caudatus	54
Abbildung 4-28:	Nekrose der Purkinje-Zellen im Kleinhirn.....	55
Abbildung 4-29:	Nekrose der Purkinje-Zellen im Kleinhirn.....	55
Abbildung 4-30:	Nekrose im Kerngebiet des Kleinhirn.....	56
Abbildung 4-31:	Expression des Hitze-Schock-Proteins 70kDa.....	57
Abbildung 4-32:	Expression pro-apoptotischer Gene Bak und FAS.....	58
Abbildung 4-33:	Expression des anti-apoptotischen Bcl-xl-Gens.....	59
Abbildung 5-1:	Beziehung der Astrozyten zu den Gefäßen des ZNS	64
Abbildung 5-2:	Zellulärer Calciumstoffwechsel	72
Abbildung 5-3:	Zelluläre Steuerung der Apoptose.....	77

1 Einleitung

1.1 Zerebrale Komplikationen in der Kinderherzchirurgie

Die enormen Fortschritte in den letzten knapp 50 Jahren auf dem Gebiet der Kinderherzchirurgie und Kinderkardiologie führten zu einer bedeutenden Abnahme der kardialen Morbidität und Mortalität, und es wurde das Interesse zunehmend auf die spätere Beurteilung der Lebensqualität und der psychomotorischen Entwicklung dieser Kinder gelenkt¹⁻⁵. Die Inzidenz einer zerebralen Komplikationen nach Herzoperationen mit Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (KSTH) und cardiopulmonalem Bypass (CPB) im Säuglings- und Kindesalter wurde auf circa 30 % geschätzt^{1,6,7}. Heute stellen die Kinder mit schweren angeborenen Herzmalformationen, wie z.B. das hypoplastische Linksherzsyndrom (HLHS) und die Transposition der großen Arterien (TGA), eine besondere Risikogruppe dar, weil sie innerhalb der Neugeborenen-Periode mit Kreislaufstillstand und tiefer Hypothermie operiert werden. In den vergangenen Jahren entstand daher ein neues Patientenkollektiv mit Kindern, die in der Säuglingsperiode kardiochirurgisch unter Verwendung des CPB operiert wurden und nun das Schulalter erreicht haben. In diesem Kollektiv war es zum ersten Mal möglich, Langzeitergebnisse kardiochirurgischer Operationen bei Kindern, die zu einem frühem Zeitpunkt ihrer psychomotorischen Entwicklung stattfanden, zu eruieren. In klinischen Follow-up Studien z.B. nach Norwood-Operationen und nach Switch-Operationen konnte herausgefunden werden, dass insbesondere die Operationstechniken, die mit Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (KSTH) einhergehen, ein ernstes Risiko für eine Beeinträchtigung der neurologischen, psychomotorischen und mentalen Entwicklung darstellen⁸⁻¹². Der Pathomechanismus neurologischer Morbidität und die Beeinträchtigung der psychomotorischen Entwicklung nach herzchirurgischen Eingriffen bei Kindern scheint multifaktoriell zu sein und zum einen auf der Besonderheit der zentralnervösen Strukturen in diesem Alter zu beruhen, zum anderen aber auch durch ischämische oder embolische Ereignisse während und nach dem cardiopulmonalen Bypass bedingt zu sein. Die Schwankungen der multiplen physiologischen Parameter während des cardiopulmonalen Bypasses können zur Aktivierung der inflammatorischen Kaskade führen und eine Hochregulation der Adhäsionsmoleküle auf neutrophilen und endothelialen Zellen bewirken¹³⁻¹⁵. Einige dieser immunologischen Prozesse können mit der Generation von Sauerstoffradikalen assoziiert sein und führen dann zu einer radikalinduzierten Lipidperoxidation auf mikrovaskulärer Ebene des ZNS^{16,17}.

Wichtige Unterschiede der Neugeborenen und der Patienten im Kleinkindesalter zu den Erwachsenen sind vorwiegend die Größe und Unreife der Organsysteme, die Unreife des Stoffwechsels und der Blut-Hirn-Schranke, der hohe Metabolismus, die hohe Herzgrundfrequenz, die geringe Herzmuskelmasse und die geringen Compliance des linken Ventrikels. Pathophysiologisch kommen bei den angeborenen Vitien, die im neonatalen Alter mit CPB und KSTH operiert werden, meistens eine Zyanose zusammen mit einer Herzinsuffizienz vor.

Der derzeitige Stand der Forschung zeigt die Probleme der Kinder auf, die mit KSTH und CPB operiert worden sind, er gibt aber durch klinische und experimentelle Studien nur ungenügend Auskunft über die pathophysiologischen Ursachen einer neurologischen Schädigung nach KSTH und CPB, und das Schädigungsmuster bleibt weiterhin unklar. Ebenso gibt es nur sehr wenige erprobte Ansätze für eine zerebrale Protektion zum Schutz der Säuglinge und Kinder während CPB und KSTH ¹⁸⁻²².

1.2 Geschichte der Kinderherzchirurgie

Die ersten chirurgischen Korrekturen angeborener Herzfehler fanden in den Jahren 1940 bis 1950 statt. 1944 wurde z.B. die erste Blalock-Taussig-Anastomose bei einem Kind mit ausgeprägter Pulmonalarterienstenose im Rahmen der damals erstmals beschriebenen Fallot'schen Tetralogie angelegt. Ebenfalls 1944 folgte dann die erste Resektion einer Aortenisthmusstenose ²³.

Die Kinderherzchirurgie entwickelte sich vor allem mit der Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine (HLM) weiter und es wurden dadurch vor allem ganz neue Operationstechniken möglich. Im Jahre 1937 entwickelten Gibbon et al eine experimentelle Maschine, die es ermöglichte, die Lungenstrombahn zu umgehen und die Herz- und Lungenfunktion zu ersetzen ²⁴. Crafoord konstruierte dann 1948 aufgrund seiner klinischen und experimentellen Erkenntnisse zusammen mit seinem Assistenten Björg eine Herz-Lungen-Maschine für die Gehirnperfusion und auch einen Oxygenator für die Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff, weil er in seinen Tierexperimenten erkannt hatte, dass die meisten Organe bei fehlender Perfusion eine Ischämie von ca. 25 Minuten ohne eine wesentlich Dysfunktion überstehen konnten, beim Gehirn lag die Ischämietoleranz jedoch bei nur 5-10 Minuten ²⁵.

Die erste klinische Anwendung der Herz-Lungen-Maschine erfolgte dann 1951 in Philadelphia zur Korrektur eines ASD-I Defektes bei einem 6 jährigem Mädchen ²⁶. Die Patientin überlebte jedoch den Eingriff nicht. Die ersten erfolgreichen Operationen mit cardiopulmonalen Bypass erfolgten dann 1952 und 1953 durch Gibbon et al. bei einem 18 jährigen Mädchen zum Verschluss eines Vorhofseptumdefektes (ASD-II) und durch Lewis und Tauffic ebenfalls zum Verschluss eines ASD-II mit Einsatz der Hypothermie ^{24;27}. Im Jahre 1954 wurden dann die ersten intrakardialen Eingriffe mittels sogenannter „Cross-Zirkulation“ als eine neue Form des cardiopulmonalem Bypasses von Lille-Hei durchgeführt, dabei konnten bei den Patienten Korrekturen eines VSD's und der Fallot'schen Tetralogie im Kindes- und Jugendalter durchgeführt werden, von denen bis heute noch circa 50 % der Patienten überlebt haben. 1954 wurde dann der Bubble-Oxygenator entwickelt, der durch die Möglichkeit der Entschäumung des Maschinenblutes mittels Silikon und damit einer deutlichen Reduktion der Gasembolien für eine klinische Anwendung besser geeignet war ²⁸. 1955 wurden dann durch Kirklin et al in der Mayo-Klinik acht Patienten in Folge mit der HLM von Gibbon operiert ²⁹. Crafoord et al. erforschten aber auch den Einfluss einer Reduktion der Körpertemperatur zur Organprotektion. Er entdeckte den Vorteil einer Oberflächenhypothermie während Herzoperationen. Die klinische Anwendung der Oberflächenhypothermie während cardiopulmonalem Bypass im Sinne einer Organprotektion wurde unter anderem von Sealy und Drew beschrie-

ben^{30;31}. Mitte der siebziger Jahre folgte dann die klinische Einführung der gezielten Myokardprotektion mit der „kalten Kardioplegie“, ein Protektionsregime mit Myokardkühlung und hohen Kaliumkonzentrationen. Die Hypothermie wurde jetzt gezielt zur Organ- und Myokardprotektion angewandt.

In Deutschland fand 1957 das erste Mal durch Zenker die Herz-Lungen-Maschine nach „Mayo-Gibbon“ ihre Anwendung. In den sechziger Jahren folgte dann die Einführung der Membranoxygenatoren. Die Technik der Herz-Lungen-Maschine wurde durch Einführung besonderer Kunststoffe, durch die Möglichkeit zur Antikoagulation (1953), die Verbesserungen der Oxygenatoren, Filter, Maschinenarten und des Perfusionsregimes ständig weiterentwickelt. Heute werden in Deutschland circa 57.000 Eingriffe mit Herz-Lungen-Maschine pro Jahr durchgeführt. Man verwendet dabei hauptsächlich Membranoxygenatoren, unterschiedliche Perfusionstechniken und unterschiedliche Säure-Basen-Regime. In den USA kommen ca. 40.000 Kinder pro Jahr mit einem angeborenem Herzfehler auf die Welt. Davon müssen die Hälfte dieser Kinder sich in ihrem ersten Lebensjahr einer Operation am offenen Herzen mit CPB und evtl. auch KSTH unterziehen^{32;33}. In Deutschland werden ca. 6000 Patienten jährlich mit einem angeborenem Herzfehler geboren.

1.3 Pathomechanismus der Hirnschädigung

1.3.1 Der Einfluss embolischer Komplikationen

Neurologische Komplikationen nach Kreislaufstillstand in tiefe Hypothermie und CPB schienen lange Zeit im Zusammenhang mit Makroembolien durch Luft und Thromben, Mikroembolien, Mikroaggregation, und inflammatorische Reaktionen zu stehen. Zusätzlich wurden zerebral vasogene Reaktionen vor allem im Bereich der Kapillaren angeschuldigt, die durch das abnormale zerebrale Perfusionsmuster bei non-pulsatilen HLM-Fluß ausgelöst werden sollten. Vor allem das Embolisationsgeschehen spielte lange Zeit eine große Rolle in der pathophysiologischen Genese zerebraler Komplikationen nach CPB³²⁻³⁵. Durch die Verbesserungen der Herz-Lungen-Maschine, durch die Einführung arterieller Filter, durch die Veränderungen von Oxygenatoren und Perfusionsregimen konnten zerebrale Komplikationen deutlich gesenkt werden. Der Umstieg von den Bubble-Oxygenatoren zu den Membranoxygenatoren und die Verwendung von arteriellen Filtern senkte die Rate der Gas- und Partikel-Mikroembolien während KSTH und CPB³⁶⁻³⁸.

1.3.2 Veränderungen der zerebralen Perfusion und Oxygenation

Alle bisher durchgeführten Studien vermochten nicht, die Kopplung zwischen Metabolismus und Blutfluss im Gehirn genau zu erklären. Besonders durch die Arbeiten von Kety und Schmidt et al. aus dem Jahre 1948 ist bekannt, dass der normale zerebrale Blutfluss (ZBF) circa 45-55 ml pro 100 g Gewebe und pro Minute beträgt^{39;40}. Bei vermehrter Aktivität in einem Hirnareal entsteht über eine metabolische Regulation eine lokale Hyperämie. Weiterhin führen Schmerzen und Stress zu einem vermutlich durch Adrenalin vermittelten Anstieg des zerebralen Blutflusses, jedoch geht eine maximale Sympathikus-

Aktivierung mit einer konsekutiven Erhöhung des ZBF um nur 5-10 % einher. Für die Veränderungen der zerebralen Perfusion von größter Bedeutung ist die zerebrale „Autoregulation“, die den zerebralen Blutfluss (ZBF) bei einem arteriellen Mitteldruck zwischen 50 mmHg und 130 mmHg stabil hält. Sinkt der arterielle Mitteldruck unter 50 mmHg, kann es zu Symptomen der zerebralen Ischämie kommen. Diese „Autoregulation“ sichert im Schlaf und bei Lagewechsel einen ZBF von mindestens 20 ml pro 100g min⁻¹ ³⁹. Bei Unterschreiten dieser „Mindestperfusion“ zeigen sich die Veränderungen im Elektroenzephalogramm (EEG) durch eine Aktivitätsminderung der Potentiale. Auch der PCO₂-Wert im Blut, die Blutzusammensetzung und der Hämatokrit-Wert haben einen entscheidenden Einfluss auf die zerebrale Perfusion. Denn z.B. eine Hypokapnie verursacht eine Vasokonstriktion und damit eine Verminderung des ZBF, wohingegen die Blutzusammensetzung vor allem die Mikroperfusion beeinflusst ^{41;42}.

Der Nachweis einer globalen Minderperfusion gestaltet sich im klinischen Alltag schwierig. In klinischen Untersuchungen konnte mit radioaktiv-markiertem Xenon während und nach CPB eine Verminderung des zerebralen Blutflusses dargestellt werden ⁴⁰. Dadurch konnte während CPB und nach KSTH eine Reduktion der zerebralen Blutflusses unter 0,2 ml g⁻¹ min⁻¹ dokumentiert werden ⁴³. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten nach KSTH kurzzeitig eine Phase der Hyperperfusion, worauf eine Phase des reduzierten zerebralen Blutflusses mit einer Erhöhung des intravaskulären Widerstandes mit Dauer bis zu acht Stunden nach dem KSTH folgte ^{44;45}. In nur wenigen tierexperimentellen Studien wurden die Veränderungen intravaskulärer und intrazellulärer Parameter, wie des PO₂-, PCO₂- und des pH-Wertes, während und nach CPB und KSTH systematisch untersucht ⁴⁶.

Die Pathogenese der Hirnschädigung während cardiopulmonalem Bypass und Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie ist sicherlich multifaktoriell, und gerade die Veränderungen nach Hypothermie zeigen gegenüber Normothermie ein deutlich abweichendes Muster der zerebralen Perfusion ⁴⁷.

1.3.3 Immunologische Veränderungen

Der cardiopulmonale Bypass stellt mit der Herz-Lungen-Maschine, den Schläuchen und der damit sehr großen Kunststoffoberfläche, durch die das Blut gepumpt wird, ein großes Risiko für eine inflammatorische Reaktion dar ¹⁴. Eine systemische Inflammation führt zu einer massiven Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und zu einer Aktivierung des Komplementsystems, wobei die Patienten nach Kreislaufstillstand höhere Werte für IL-6 und IL-8 aufwiesen, als die Patienten welche nur einem cardiopulmonalen Bypass ausgesetzt waren ⁴⁸. Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie führt aber nach der hypothermen Phase zu Beginn der Reperfusion und Wiedererwärmung zu einem erhöhten Anfall von Zytokinen und aktivierten Leukozyten ⁴⁸⁻⁵¹. Insgesamt konnte durch die Erniedrigung der Temperatur während des hypothermen Bypasses aber eine deutlich geringere inflammatorische Reaktion beobachtet werden, als bei normothermem CBP ¹⁴. Es konnte nachgewiesen werden, dass milde Hypothermie immunologische Parameter beeinflusst. Eine durch den CPB initiierte Komplement-Aktivierung und somit auch eine verstärkte zelluläre Antwort der neutrophilen Granulozyten konnte durch Hypothermie reduziert werden ⁵².

Auch eine Endotoxinämie scheint signifikant häufiger während CPB aufzutreten⁴⁸. Das Auftreten von Endotoxinen führt wiederum zur Bildung von Zytokinen, unter anderem auch zur IL-6-Bildung, welches als inflammatorischer Marker sekundär zu Veränderungen der Neuronen führen kann⁴⁸. Nach KSTH konnte ein Persistieren erhöhter IL-6 und IL-8 Werte beobachtet werden. Ashraf et al stellten ebenfalls fest, dass es neben der Erhöhung der Interleukine ebenfalls zu höheren Werten für das astrogliale Protein S100B kam, und folgerten daraus eine mögliche inflammatorisch bedingte Ursache einer astroglialen Alteration⁴⁸.

Durch eine Methylprednisolongabe bei CPB und KSTH konnte eine Reduktion von Zytokinen und TNF- α dokumentiert werden⁵³. Es konnte sogar eine Erhöhung antiinflammatorischer Parameter wie IL-10 nachgewiesen werden^{51;54-56}. Diese Veränderung der inflammatorischen Reaktion durch die Methylprednisolongabe nach CPB und KSTH wurde als einer der möglichen Mechanismen einer neuroprotektiven Wirkung gewertet.

1.3.4 Metabolische Veränderungen

Zellulärer Adenosin-tri-phosphat(ATP)-Mangel der Neuronen führt zu erhöhten intrazellulären Ca^{++} - und Glutamat-Spiegeln, sowie zur Bildung von zellschädigenden Sauerstoffradikalen durch eine Dysfunktion der Mitochondrien. Vom ATP abhängig werden Ca^{++} -Ionen und Glutamat aus der Zelle befördert. Glutamat bewirkt durch Aktivierung des NMDA- und des AMPA-Rezeptors unter anderem einen Ca^{++} -Einstrom in die Zelle. Durch ATP-Mangel versagt die Na/K-ATPase und Na wird zusammen mit Glutamat aus der Zelle geschleust. Dies führt zu einer Up-Regulation der Glutamat-Rezeptoren, zu erhöhten intrazellulären Glutamatspiegeln und dadurch zu höheren intrazellulären Ca^{++} -Spiegeln – ein *circulus vitiosus*. Das Calcium wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) und in den Mitochondrien gespeichert. Aufgrund unterschiedlicher Stimuli wird Ca^{++} freigesetzt und reguliert viele physiologische Stoffwechselprozesse. In einer ischämisch geschädigten Nervenzelle nehmen ER und Mitochondrien weniger Ca^{++} auf, so dass das zytosolische Ca^{++} bis auf toxische Werte ansteigen kann. Das intrazelluläre Ca^{++} aktiviert Prozesse, die zur Bildung von Arachidonsäure (Aktivierung via Phospholipase A2) und zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) führen können. Dieses kann am Ende zur Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion führen^{57;58}. Mitochondrien können aber auch neben den oben beschriebenen Vorgängen einen möglichen Zelltodes via Apoptose und Nekrose initiieren. Zur Initiierung der Apoptose aktivieren die in Mitochondrien aufgenommenen Ca^{++} -Ionen die mitochondriale Permeabilitätspore (mtPTP). Diese lässt das intramitochondriale Ca^{++} ausströmen und bedingt so wiederum toxisch hohe zytosolische Ca^{++} -Spiegel. Durch hohe intrazelluläre Calciumspiegel und mitochondrialen Dysfunktion kann es schnell zum zellulären Energiemangel kommen, was zu einer Zellnekrose führt. Auf der anderen Seite kann die Freisetzung mitochondrialen Cytochrom C in das Zytoplasma eine Aktivierung der Caspase-Kaskade mit anschließender Apoptose bedingen⁵⁹.

Durch Ischämie und Hypoxie kann es ebenfalls zu einer verstärkten Bildung freier Sauerstoffradikale kommen. Diese sind z.B. das Superoxid-Anion H_2O_2 , das nicht mehr physiologisch zu Wasser, sondern unter dem Einfluss von pathologisch vorhandenen Eisen-Ionen zu Hydroxyl-Radikalen (OH^\cdot) umgewandelt wird und weiter das sehr reagible Peroxynitrat, das aus dem vom Arginin stammendem NO gebildet wird ⁶⁰. Diese freien Radikale reagieren irreversibel mit Zellproteinen, Phospholipiden und nukleärer DNA, was zur Dysregulation von Stoffwechselprozessen und zu Gen-Mutationen führt. Außerdem werden durch diese Radikale auch eine sekundäre Entzündungsreaktion hervorgerufen, wobei Leukozyten per Migration durch die Gefäßwand im Hirngewebe schädigende Proteasen und Zytokine freisetzen ⁶¹. Dass Radikale eine wesentliche Rolle in der Entstehung einer hypoxisch-ischämischen Nervenzellschädigung nach CPB und KSTH spielen, konnten Studien mit Radikalfänger wie z.B. Q10 zeigen, welche zu einer Verbesserung des Schädigungsmusters führten ^{62;63}. Daneben wird ein potentiell neuroprotektiver Effekt durch Na^+ -, Glutamat- und Ca^{++} -Kanal-Blocker, Adenosin-Agonisten, K^+ -Kanal-Aktivatoren und Wachstumsfaktoren untersucht. Freie Radikale können je nach Konzentration einen nekrotischen oder auch apoptotischen Zelltod mit sich bringen ⁵⁹.

1.3.5 Einfluss der Hypothermie

Die Hypothermie bedeutet eine Reduktion der systemischen Körpertemperatur. Man unterscheidet milde Hypothermie mit einer Temperatur von 35 bis 30°C, moderate Hypothermie mit Temperaturen von 29 bis 25 °C und tiefe Hypothermie mit einer Temperatur von 25 bis 15°C. Der Mensch kann einen normothermen Kreislaufstillstand für 3-5 Minuten ohne dauerhaften zerebralen Schaden überstehen. Bei 28° bis 30°C verlängert sich die ischämische Toleranz des Gehirns auf 8 bis 10 Minuten und bei einer systemischen Temperatur unter 20°C auf bis zu 40 Minuten ^{64 65}.

Der Gesamtmetabolismus des Gehirns setzt sich aus Aktivitätsstoffwechsel und Basalstoffwechsel zusammen. Dabei besteht der Aktivitätsstoffwechsel aus dem Energiebedarf bei einer normalen neuronalen Aktivität und Erregungsleitung. Der Basalstoffwechsel ist der Energiebedarf, der nach vollständiger Suppression der hirnelektrischen Aktivität z.B. im Rahmen der Narkose noch existent und für das Überleben der Zelle essentiell ist. Ungefähr 50 % des Basalstoffwechsels wird für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials aufgewandt und die andere Hälfte für Calcium-Transporter, Zellbausteinsynthese und axoplasmatischen Transport. Die Hypothermie setzt die Aktivität aller zerebralen Stoffwechselprozesse herab. Die Erniedrigung der zerebralen metabolischen Rate für Sauerstoff (CMRO2) ist ein wichtiger Effekt der Hypothermie, mit sinkender Temperatur sinkt die CMRO2 um circa 7-10 % pro Grad Celsius ^{64;66}. Aber einzig dieser Mechanismus kann für eine neuroprotektive Wirkung nicht verantwortlich sein, denn eine pharmakologisch induzierte Erniedrigung der CMRO2 führte nicht zu einer vergleichbaren ischämischen Toleranz ⁶⁷. Obwohl ebenfalls die Hypothermie den ATP-Verbrauch senkt, so scheint aber wiederum der ATP-Verbrauch nicht mit einer zerebralen Schädigung zu korrelieren ^{68;69}.

Ein weiteres Augenmerk wurde bei der Wirkung der Hypothermie auf die Mediatoren und Stoffwechselprodukte der Ischämie wie Glutamat und Sauerstoffradikale gelenkt ⁷⁰. Glutamat ist ein Neurotransmitter und zugleich aber auch neurotoxisches Protein und kommt in den Nervenendigungen in millimolarer Konzentration vor. Sein extrazelluläres Vorkommen ist an eine Wiederaufnahme gebunden, und die Ischämie führt dabei zu einer Erhöhung der extrazellulären Konzentration und einer Verschlechterung der Wiederaufnahme. Extrazelluläre Konzentrationen im mikromolaren Bereich sind neurotoxisch und führen über eine NMDA-Rezeptor-Aktivierung und Calcium-Einstrom zu einem nekrotischen Zelltod. Schon milde Hypothermie reduziert deutlich den extrazellulären Glutamat-Anstieg ^{57 70}.

Milde Hypothermie beeinflusst auch immunologische Parameter: es wird eine durch den CPB initiierte Komplement-Aktivierung deutlich abgeschwächt und die zelluläre Antwort der neutrophilen Granulozyten reduziert ⁵². Doch ebenso wurde beobachtet, dass im Rahmen der Wiedererwärmung und Reperfusion nach Hypothermie eine verstärkte Komplementaktivierung stattfindet. Diese Aktivierung könnte wiederum zu einer verstärkten Komplement-induzierten Granulozytenaggregation führen, eine Quelle für die Bildung von Mikroemboli und einer globalen Entzündungsreaktion ^{52;71}.

In Messungen mit transkranieller Dopplersonographie (TCD) fand man heraus, dass man nach Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie einen erhöhten zerebralen Perfusionsdruck braucht, um überhaupt einen zerebralen Fluss zu registrieren ⁷². Eine erhöhte Rate zerebraler Komplikationen nach Hypothermie wurde ursächlich auf die Entstehung eines Ischämie-Reperfusionsschadens zurückgeführt. Es wurden Laktatazidose und Hyperglykämien registriert ^{73;74}, zusammen mit einer verspäteten Reaktivierung der zerebralen Funktionen durch EEG-Ableitung ⁷⁵. Man beschrieb also für die Hypothermie eine durchaus neuroprotektive Wirkung, eingeschränkt durch das Wissen, dass es bei Wiedererwärmung und Reperfusion dann zu einer durchaus unphysiologischen Kombination aus einer Störung der zerebralen Perfusion und Oxygenation, sowie einer immunologischen Reaktion kommen kann ⁶².

Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie bewirkt auf zellulärer Ebene eine sogenannte „kalte Ischämie“, welche sich pathophysiologisch und auch in dem Ausmaß der Schädigung deutlich von den Veränderungen während einer normothermen Ischämie unterscheidet. Die Hypothermie erhöht die ischämische Toleranz des Gehirns bei fokaler und globaler Ischämie. Der Mechanismus der Neuroprotektion ist multifaktoriell durch eine intra- und extrazelluläre Wirkung bedingt. Ob es neben protektiven Effekten auch schädigende Effekte durch die Hypothermie gibt, bleibt weiter unklar, und das Risiko und die Nebenwirkungen scheinen gerade auf eine lange postoperative Zeit gesehen ungeklärt.

Eine zeitliche Begrenzung der allein durch Kühlung bedingten protektiven Wirkung der tiefen Hypothermie bei totalem Kreislaufstillstand scheint bei ungefähr 60-70 Minuten zu liegen ^{64;76}. Bei längeren Stillstandsphasen scheint eine alleinige Hypothermie an die Grenzen ihrer Wirksamkeit zu treten ⁷⁷.

1.3.6 Ursachen einer zerebralen Schädigung (Zusammenfassung)

Die während CPB und KSTH verursachte Hirnschädigung ist multifaktoriell. Es können eine Vielzahl von Ursachen zugrunde liegen, wobei nachfolgende Aufzählung einen Überblick verschaffen soll:

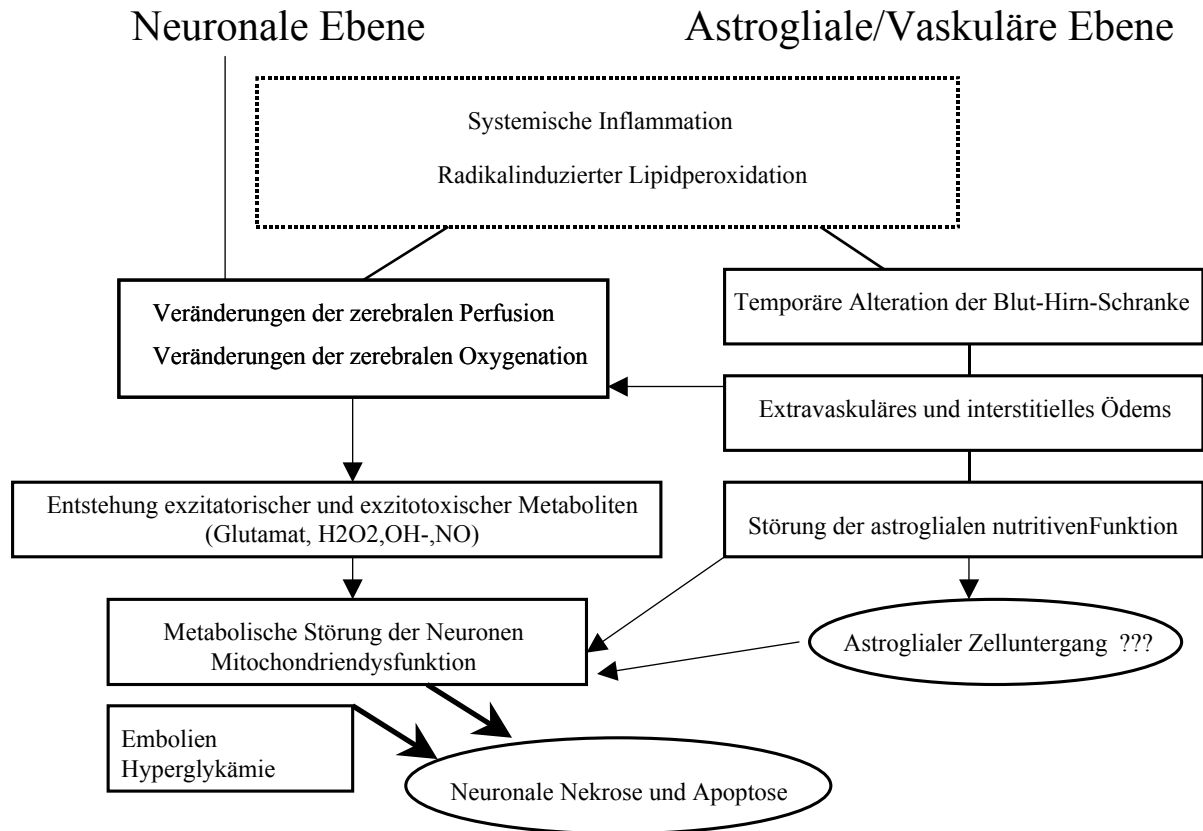


Abbildung 1-1: Pathomechanismus der Hirnschädigung nach Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie und cardiopulmonalem Bypass

Als offensichtlich kritische Zeitpunkte einer durch CPB und Kreislaufstillstand ausgelösten Schädigung kommen in Betracht:

- Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine
- Periode des Kreislaufstillstandes mit verbundener zellulärer Ischämie
- Phase der Ischämie-Reperfusion nach dem Kreislaufstillstand
- Postoperative Phase mit sekundärer Schädigung durch Metaboliten und Radikale

1.3.7 Antikoagulation

Ebenfalls wurde der Einfluss der Antikoagulation und auch die Möglichkeit eines protektiven Effektes auf das Gehirn während CPB untersucht. Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich des neurologischen Outcomes der Patienten mit oder ohne Heparintherapie⁷⁸. Die Heparindosis sollte so niedrig wie möglich gewählt werden, die Art des Heparin's aber hat keinen Einfluss auf das neurologische Outcome⁷⁸.

1.3.8 Hämodilution

Die Auswirkung einer Erniedrigung des Hämatokrit-Wertes unter 25% (=Hämodilution) während CPB und KSTH ist umstritten. Eine Hämodilution sollte vor allem die Fließgeschwindigkeiten auf kapillärer Ebene verbessern und ein sogenanntes Sludge-Phänomen, bei dem sich die Erythrozyten in den Kapillaren stauen, verhindern. Zwar konnte eine Verbesserung der zerebralen Perfusion durch die Erniedrigung des Hämatokrits nachgewiesen werden, jedoch stand diese Veränderung im Gegensatz zu den Verschlechterungen der Oxygenation⁷⁹. Eine Hämodilution bewirkt im Gehirn eine deutliche Veränderung des zellulären Sauerstoffangebots, wodurch es zu einer kompensatorischen Erhöhung des zerebralen Blutflusses kommt. Es zeigt sich jedoch eine Limitation dieser Kompensation. Hämatokritwerte unter 15% zeigten eine deutliche Verschlechterung der zerebralen Oxygenation und des zerebralen Sauerstoffangebots⁸⁰. Hämodilution bedeutet eine Erniedrigung der Träger für Sauerstoff im Blut, was sich negativ auf die zelluläre Oxygenation auswirkt⁷⁸. Durch eine Hyperperfusion versucht das Gehirn dann das Sauerstoffangebot zu verbessern. Diese Hyperperfusion wurde in einigen Studien als Zeichen einer zerebralen Protektion gewertet^{20;79}. Die Optimierung des intravaskulären und damit auch interzellulären Sauerstoffangebots sollte während CPB und auch vor und nach Kreislaufstillstand im Vordergrund stehen. Dieses kann vor allem durch eine Optimierung der Anzahl Sauerstoffträger (Erythrozyten) im Blut und durch ein ausreichendes Angebot intravaskulär verfügbarem Sauerstoff (PO₂) erreicht werden. Eine Hämodilution bedeutet eher eine Erniedrigung der Sauerstoffträger und somit auch eine Erniedrigung des intravaskulären und auch zellulären O₂-Angebotes. Zahlreiche Studien wiesen daher auch auf den protektiven Effekt höherer Hämatokritwerte hin⁸¹.

1.4 Tierexperimentelle Studien

Neben vielen klinischen Studien und Untersuchungen gibt es zahlreiche Ansätze für Grundlagenforschung, Deduktion pathophysiologischer Zusammenhänge und Evaluierung von Interventionen ermittelt im Tiermodell mit KSTH. Das experimentelle Protokoll differiert deutlich zwischen den experimentellen Studien. Es gibt Abweichungen im Perfusionsprotokoll, der Tierart, der Dauer des KSTH, der Auswertung und der versuchten Intervention. Einige experimentelle Studien nutzten wesentlich kürzere Stillstandszeiten (etwa von 60 Minuten bis 90 Minuten) zur Evaluation der Veränderungen von Perfusion und Oxygenation⁸². Jedoch wurde nur in wenigen Fällen eine morphologische Untersuchung durchgeführt, wie z.B. bei der Versuchsgruppe von Cooper et al. oder Bokesch et al., die bei 60 bis 90 Minuten KSTH keine Nervenzellschädigung detektieren konnten^{77;83}.

Neugeborene Ferkel (< 14 Tage) wurden nur in wenigen anderen experimentellen Studien benutzt. Dabei wurden Kreislaufstillstandszeiten in tiefer Hypothermie von 90 bis 120 Minuten angewendet, um überhaupt eine histologisch sichtbare ischämische Veränderung im Gehirn zu erhalten. Hierzu zählen die Studiengruppe der Duke University⁸⁴, die John Hopkins University Baltimore⁸⁵, die Studiengruppe der Har-

vard University in Boston ⁸⁶, aus Cleveland, Ohio ⁷⁷, der University of Southampton ⁸⁷ und des Children's Hospital in Philadelphia ⁸⁸.

Eine aktuelle Studie an neugeborenen Ferkeln aus dem Jahr 2000 verwendete 60 Minuten KSTH und eine neuroprotektive Intervention mit Methylprednisolon ²⁰. Diese Studie verzichtete aber auf eine neuropathologische Untersuchung und die Untersucher interpretierten ihre Perfusions- und Oxygenationsmessungen als Anzeichen einer Neuroprotektion durch Steroide.

Weitere Interventionen wurden durch die Veränderungen des Perfusionsregimes evaluiert, zum Beispiel durch die Gegenüberstellung von pulsatilen zu nicht- pulsatilen Flussmustern ⁸⁹, durch retrograde zerebrale Perfusion während KSTH ⁹⁰, durch intermittierende Perfusion während KSTH ⁹¹ und durch Interventionen am Nitric Oxid Stoffwechsel mit Gabe des NO-Donors Arginine ⁹². Aber nur in wenigen Studien wurden die Morphologie nach dem Versuch beurteilt und daraus mögliche Rückschlüsse über eine Zellprotektion angestellt.

Erstautor	Journal	Jahr	Tierart	KSTH (min)	Temp. °C	Histologie
Shum-Tim	Ann Thorac Surg 72(5): 1465-72	2001	Ferkel	100	15	Protektion
Kurth	Anesthesiology 95(4): 959-64.	2001	Ferkel	90	19	Protektion
Juvonen	Eur J Cardiothorac Surg 20(4): 803-10	2001	Schweine	90	20	Positiv
Nollert	Thorac Cardiovasc Surg 48(4): 247-53	2000	Ferkel	120	15	Positiv
Cooper	Ann Thorac Surg 69(3): 696-703.	2000	Schweine	60	18	Positiv
Langley	Eur J Cardiothorac Surg 17(3): 279-86	2000	Ferkel	60	18	Keine
Shinòka	Ann Thorac Surg 69(2): 578-83	2000	Ferkel	60	15	Positiv
Abdul-Khaliq	Eur J Cardiothorac Surg 18(6): 729-31	2000	Ferkel	120	15	Positiv
Abdul-Khaliq	Clin Chem Lab Med 38(11): 1169-72.	2000	Kaninchen	60	15	Negativ
Kin	Cardiovasc Surg 7(5): 558-64	1999	Hund	90	15	Positiv
Kurth	J Thorac Cardiovasc Surg 118(6): 1068-77	1999	Ferkel	90	15	Positiv
Nagashima	Ann Thorac Surg 68(2): 499-505.	1999	Lämmer	90	18	Keine
Langely	Ann Thorac Surg 68(5): 1578-85.	1999	Ferkel	60	18	Keine
Langely	Ann Thorac Surg 68(1): 4-13	1999	Ferkel	60	18	Nekrose
Undar	Ann Thorac Surg 68(4): 1336-43	1999	Ferkel	60	18	Keine
Undar	Artif Organs 23(8): 717-21	1999	Ferkel	60	18	Keine
Bokesch	Anesthesiology 89(4):961-8.	1998	Lämmer	120	16	Positiv
Nagashima	Circulation 98(19 Suppl): II378-84	1998	Lämmer	120	18	Keine
Ye	Circulation 98(19 Suppl): II313-8	1998	Schweine	120	15	Positiv
Juvonen	Ann Thorac Surg 66(1): 38-50	1998	Schweine	90	20	Positiv
Undar	Artif Organs 22(8): 681-6	1998	Ferkel	60	18	Keine
Bokesch	Ann Thorac Surg 64(4): 1082-8.	1997	Lämmer	120	15	Positiv
Undar	Asaio J 43(5): M482-6	1997	Ferkel	60	18	Keine
Bokesch	Anesthesiology 85(6):1439-46.	1996	Lämmer	120	15	Positiv
Miura	Circulation 94(9 Suppl): II56-62.	1996	Ferkel	100	15	Positiv
Skaryak	Ann Thorac Surg 62(5): 1284-8	1996	Ferkel	90	18	Keine
Tsui	Ann Thorac Surg 61(6): 1699-707	1996	Ferkel	60	18	Keine
Kirshbom	Circulation 92(9 Suppl): II490-4.	1995	Ferkel	90	18	Keine
Fessatidis	Eur J Cardiothorac Surg 7(9): 465-72	1993	Ferkel	120	15	Positiv
Scheller	J Thorac Cardiovasc Surg 104(5): 1396-404	1992	Schweine	60	18	Positiv
O'Conner	Cryobiology 1986 Dec;23(6):483-94	1986	Hund	180	13	Keine
Molina	J Thorac Cardiovasc Surg 1984 Apr;87(4):596-604	1984	Hund	60	18	Negativ
Fisk	Anaesth Intensive Care 1976 May;4(2):126-34	1976	Schweine	85	20	Positiv
Fisk	Anaesth Intensive Care 1974 Feb;2(1):33-42	1974	Ferkel	60	20	Positiv
Kramer	J Thorac Cardiovasc Surg 1968 Nov;56(5):699-709	1968	Hund	60	4	Negativ

Abbildung 1-2: Literaturübersicht der tierexperimentelle Studien

Wenn eine histologische Evaluation durchgeführt wurde, steht positiv für das Vorkommen nekrotischer oder apoptotischer Neuronenveränderungen. Negativ bedeutet keine histologischen Veränderungen. Keine steht für Studie ohne Histologie. Die histologische Evaluation war in 45 % der Fälle positiv, wurde aber nur in 1/3 der angegebenen Studien durchgeführt und die meisten Studien mit histologischer Evaluation erhoben nur semiquantitativ einen Score.

1.4.1 Morphologische Evaluation des Gehirns

Die tierexperimentellen Studien zeigen unterschiedliche histologische Schädigungsmuster im Gehirn bei KSTH. Einen Einfluss auf die Ausprägung der Schädigung im Gehirn scheint die Dauer der Ischämiezeit in Hypothermie und die Temperatur zu haben. Einige Studien zeigten, dass es bei 60 Minuten KSTH in tiefer Hypothermie und einer postoperativen Überlebenszeit von bis zu 3 Tagen nur zu einer gering ausgeprägten Nervenzellschädigung kommt^{17,93}. Erst bei KSTH von mehr als 60 Minuten und 4-6 postoperativen Stunden war eine signifikante Neuronenschädigung sichtbar^{77;87;94}. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass bei Stillstandsphasen, die länger als 60 Minuten dauern, trotz tiefer Hypothermie Neuronschäden zu erwarten sind⁹⁵. Zusätzlich konnte in einer experimentellen Studie ausgeschlossen werden, dass das Alter der Tiere in einem Bereich zwischen 1 und 10 Wochen einen Einfluss auf die morphologischen Ergebnisse hat⁹⁶.

Es gibt nur wenige Studien, die eine längere postoperative Überlebenszeit aufweisen. Eine dieser Studien ist die Untersuchung von Kurth et al, die unterschiedliche Überlebenszeiten von 6 Stunden und 1 bis 7 Tagen evaluiert hat⁸⁸. Dabei lag das Ausmaß der histologischen Schädigung nach 6 postoperativen Stunden nur gering unter der maximalen Nervenzellschädigung nach 2 Tagen, und es zeigte sich dann wieder eine signifikante Abnahme der Neuronenveränderungen nach einer Woche. Dieses Studie zeigte, dass ein postoperativer Intervall von 6 Stunden zu einer durchaus reproduzierbaren Detektion des Schädigungsmuster nach KSTH führt. Eine längere Überlebenszeit der Tiere ist technisch sehr schwierig umsetzbar.

Das Gehirn verfügt über einen hohen Metabolismus im Verhältnis zum restlichen Körper, ist sehr anfällig gegenüber Hypoxie und Ischämie und besitzt nur geringe Speichermöglichkeiten für Sauerstoff, energiereiche Phosphate und Kohlenhydrate. Ischämische Hirnschädigung wird durch eine Kombination einer Vielzahl von pathophysiologischer Faktoren verursacht. Auf der einen Seite spielt eine signifikante Alteration der zerebralen Perfusion eine Rolle, auf der anderen Seite werden viele biochemische und immunologische Kaskaden aktiviert, die eine sekundäre Zellschädigung begünstigen. Aber die Anfälligkeit der einzelnen Neurone variiert je nach Hirnregion und wird in der Literatur als „selektive Vulnerabilität“ bezeichnet⁹⁷. Bei der Untersuchung der Neurone im Hippocampus wurde in zahlreichen Studien eine „selektive Vulnerabilität“ nach ischämischer Schädigung beschrieben, was bedeutet, dass die einzelnen Strukturen – wie Cornu ammonis (CA) 1-4 und der Gyrus dentatus – in diesem Bereich ein unterschiedliches Schädigungsmuster aufweisen.

Bisher wurde in vielen Studien die hohe Anfälligkeit des Sektors CA 1 („Sommer-Sektors“) für hypoxische und ischämische Schädigung beschrieben, bei vergleichsweise geringen Veränderungen in den ande-

ren Sektoren des Ammonshorns wie CA 2-4 und dem Gyrus dentatus⁸⁸. Einige tierexperimentelle Studien mit KSTH betrachten sogar nur den Sektor CA 1⁹⁴, andere wiederum zeigten ein abweichendes Muster. Der Fokus der Schädigung lag nicht mehr nur im Sektor CA 1, sondern im Sektor CA 4 und es zeigte sich ein nur moderater Zellschaden in den Sektoren CA 3, CA 2, Gyrus dentatus und CA 1^{98;99}.

Die lichtmikroskopische Klassifikation ischämisch geschädigter Neurone im Gehirn erfolgte in den meisten Studien und auch in dieser Untersuchung nach den gängigen neuropathologischen Kriterien^{100;101}. Zum Zelluntergang führt eine hypoxische oder ischämische Schädigung mit Störung der Sauerstoffverfügbarkeit auf zellulärem Level, der oxidativen Energiegewinnung und der Glykolyse. Zusätzlich führen auch endotheliale Vorgänge, wie Komplementaktivierung und Bildung von Sauerstoffradikalen zum Zelluntergang.

Für den Zellenuntergang bzw. Zelltod sind zwei unterschiedliche Formen beschrieben, die Nekrose und Apoptose.

1.4.2 Nekrose

Die Nervenzellnekrose ist charakterisiert durch Eosinophilie des Zytoplasmas mit untergeordneten Kernveränderungen in Form von Kernpyknose und Kernbasophilie^{97;102-104}. Ultrastrukturell wurde eine Schwellung und Dilatation der Mitochondrien und anderen Zellorganellen, sowie eine Ruptur der Zellmembran beobachtet. Die Detektion dieser Veränderungen erfolgt am besten mittels lichtmikroskopischer Betrachtung der Schnitte in Hämatoxylin und Eosin-Färbung (HE-Färbung).

1.4.3 Apoptose

Die Apoptose wurde das erste Mal 1972 von Kerr et al. so benannt und ist charakterisiert durch die Fragmentation der Zelle bei gleichzeitigem Erhalt der Zellmembran. Es zeigen sich charakteristische Kernveränderungen in Form einer Heterochromatin-Kondensation und einer Kernfragmentation^{100;105}. Die Apoptose ist ein aktiver Prozess und bedarf Energie. Morphologisch kommt es zu den charakteristischen Kernveränderungen mit zentrifugaler Chromatinansammlung am Rand der Zelle, Kondensation und einer DNA-Fragmentation mit großen und kleinen Fragmenten¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Der Zellkern bildet sich dann um in kleine runde Chromatin-Körperchen, sogenannte apoptotische Körperchen. Aber die Zellorganellen des Zytoplasmas bleiben intakt, es kommt zu keiner Schwellung der Mitochondrien wie bei der Nekrose und eine inflammatorische Reaktion bleibt aus⁵⁹. Die Fragmente und apoptotischen Körperchen werden dann von Nachbarzellen phagozytiert, wobei diese Zellen normalerweise nicht zur Phagozytose fähig sind.

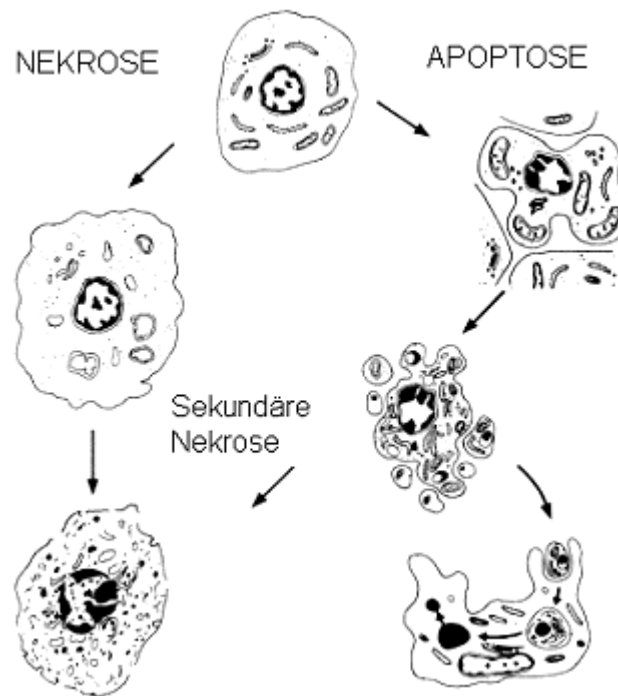


Abbildung 1-3: Abfolge der morphologischen Veränderungen von Nekrose und Apoptose

Die Integrität der Zellmembran bei der Apoptose ist einer der wesentlichen Unterschiede zur Nekrose. Dort wird die Zellmembran lytisch zerstört und es kommt zum Austreten schädlicher Substanzen und Transmitter, wie z.B. Calcium und Glutamat. Glutamat ist ein Exotoxin, wobei schon geringe zelluläre Konzentrationsänderungen zum nekrotischen Zelltod führen können.

Die Apoptose kann somit als Zelluntergang einzelner Zellen in einer Umgebung intakter Zellen stattfinden und durch die Phagozytose der apoptotischen Zellen in einem Zeitraum von zwei bis vier Stunden kommt es zu keinerlei Beeinflussung der umliegenden Zellen¹⁰⁸. Die Apoptose wird daher gegenüber der Nekrose auch als ein schonender und organisierterer Zelluntergang bezeichnet. Apoptose und Nekrose können aber auch zugleich stattfinden oder hintereinander ablaufen wenn z.B. nicht genügend Energie für eine Apoptose verfügbar ist, wodurch dann auch die apoptotischen Zellen lytische Prozesse durchlaufen¹⁰⁹⁻¹¹².

Der Hippocampus ist ein typisches Beispiel dafür, dass Apoptose und Nekrose nebeneinander vorkommen können, sich aber in ihrer regionalen und lokalen Verteilung unterscheiden. Die Nervenzellen in dieser Region reagieren unterschiedlich und ihre Reaktion ist abhängig vom pathogenen Stimulus. Nach fokaler Ischämie fand man unmittelbar in der Nähe des verschlossenen Gefäßes eine umrahmte Region mit nekrotischem Zelluntergang, die sogenannte Kernregion. Abgrenzbar dazu zeigte sich um die Kernregion, dort wo der Energiemangel und auch die Ischämie schwächer ausgeprägt war, weniger Nervenzellnekrose, dafür aber signifikant mehr apoptotische Veränderungen^{88,112,113}. Ebenfalls wurde beobachtet, dass Unterschiede z.B. in der Verteilung der NMDA-Rezeptoren zwischen den Neuronen des Cornu ammonis (CA) und des Gyrus dentatus für die Veränderungen nach Ischämie verantwortlich sein können, sowie das

Ausmaß und die Form des Zellunterganges mitbestimmen⁹⁸. Die zellulären Prozesse von Apoptose und Nekrose besitzen ähnliche Komponenten. Bei beiden Formen spielen z.B. der „Second-messenger“ Calcium, zelluläre Enzyme und Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-fos, eine Rolle. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass ein hochspezifisches Signalmolekül der Apoptose, die Caspase 8/10, ebenfalls bei Nekrose eine Rolle spielt¹¹⁴, genauso wie die spezifische Sensitivität für Bcl-2 nach Hypoxie und oxidativem Stress auch bei der Nekrose existent zu sein scheint¹¹⁵. Trotzdem führen intrazelluläre Prozesse, Enzymwirkungen und Produktion von Botenstoffen zu der unterschiedlich morphologischen Form des Zellunterganges. Die Form ist dabei abhängig von Intensität und Dauer des schädlichen Stimulus. Wenn die Schädigung fulminant ist und die Zelle einen Energieträgermangel ausgesetzt ist, dann kann sich das Bild des Zelltodes wandeln von der Apoptose zur Nekrose¹¹¹.

1.5 Untersuchung einer neuroprotektiven Strategie

Das Verständnis des Pathomechanismus der Hirnschädigung und die Kenntnis der Veränderungen während und nach dem operativen Eingriff sollten die Grundlage bilden für die Entwicklung neuroprotektiver Strategien und pharmakologischer Interventionen. Diese Erkenntnisse können am besten in einem Tiermodell gewonnen und auf ihre Wirksamkeit überprüft werden.

Wir haben ein experimentelles Bypassmodell zur weiteren Evaluierung neurophysiologischer, biochemischer, histologischer und ultrastruktureller Veränderungen etabliert^{17;116}. Die ersten histologischen und immunhistochemischen Ergebnisse bei Kaninchen und bei neonatalen Schweinen zeigten bei einem Kreislaufstillstand von 60 Minuten ein neuropathologisches Schädigungsmuster in Form eines ausgeprägten perivaskulären astrozytären Ödems und weniger eine Schädigung der Neuronen. Die astroglialen Zellen, die 50-60% der Hirnmasse ausmachen, spielen eine vitale Rolle im nutritiven Transport, Metabolismus der Neurotransmitter und in der mechanischen Unterstützung und Plastizität des Zentralnervensystems. Die ausgeprägte Schwellung und extrazelluläre Flüssigkeitsansammlung bestätigten unsere Hypothese einer primären pathognomonischen Reperfusionsschädigung in den einzelnen Hirnabschnitten, mit einer Störung des nutritiven Transports zu den Neuronen, aus der eine Neuronenschädigung resultieren könnte¹⁷.

Eine zerebrale Protektion in der klinischen Praxis sollte vor allem die oben genannten neuropathologischen Aspekte berücksichtigen. In einem Tiermodell sollte zuerst eine Evaluierung der pathophysiologischen Zusammenhänge, die zu einer neuronalen Schädigung führen, überprüft werden. Dann sollten neuroprotektive Strategien angewendet und analysiert werden^{33;88;95;117-119}. Im Gegensatz zu der bisherigen Möglichkeit, bei Erwachsenen und Kindern erst nach einem hypoxisch-ischämischen Ereignis die unmittelbaren und späteren Folgen behandeln zu können, haben wir die Chance, durch die pharmakologische Behandlung vor und während der invasiven Prozedur, die Entstehung möglicher zerebraler Schädigungen entscheidend zu beeinflussen.

1.5.1 Klinische und experimentelle Anwendung der Steroide

Steroide werden in vielen unterschiedlichen klinischen Fachdisziplinen eingesetzt zur Vorbeugung und Behandlung von inflammatorisch bedingten Zellveränderungen, endothelialer Permeabilitätsstörungen und einer posttraumatischen oder ischämischen Ödembildung¹²⁰⁻¹²³. Im Rahmen der Herzchirurgie und des CPB werden Steroide und Methylprednisolon schon seit 1966 eingesetzt, ursprünglich mit dem Ziel die kardiale Funktion nach CPB zu verbessern^{124;125}.

Eine neuroprotektive Wirkung der Steroide wird seit langem zusätzlich vermutet, vor allem im Zusammenhang mit einer ischämisch-entzündlichen Genese, einer Nervenzellschädigung des zentralen und peripheren Nervensystems, wobei die Reduktion inflammatorischer Parameter und Interleukine experimentell und klinisch nachgewiesen werden konnte¹²⁶⁻¹²⁸. Trotzdem wird die Fähigkeit der Steroide zur Prävention einer neuronalen Schädigung und einer zerebralen Ödembildung nach einem traumatischen oder ischämischen Einfluss seit langem kontrovers diskutiert.

Die pathophysiologische Grundlage für den Einsatz von Steroiden für den Zweck einer Zellprotektion bilden vielfältige Mechanismen, wobei ein ödemreduzierender Effekt durch Jamshidi et al beschrieben und ein antioxidaktiver Effekt in zwei weiteren Studien beobachtet wurde^{121;129;130}. Außerdem haben Steroide eine multi-inhibitorische Wirkung auf eine Vielzahl von Komponenten des inflammatorischen Systems im Körper. Steroide sind in der Lage, die Makrophagen-Funktion zu hemmen, die Expression der inflammatorischen Zytokine TNF-alpha, IL-6 und IL-8, sowie eine Komplementaktivierung zu reduzieren und gleichzeitig antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 zu erhöhen^{53;54;131;132}. Die Quelle für die erhöhte Konzentration des antiinflammatorischen IL-10 scheint dabei die Leber zu sein⁵⁵. Eine weitere Wirkung zeigte sich in der Verminderung exzitatorischer Aminosäuren, und auch ein verbessernder Einfluss auf den zerebralen Blutfluss wurde beobachtet^{122 20 133 128}. Jedoch lassen die Verabreichung der Steroide und die Art der ischämischen Schädigung in dem jeweiligen Studiendesign aufgrund der fehlenden ausführlichen morphologischen Untersuchung nicht unbedingt eine direkte neuroprotektive Wirkung erkennen. Und ein wirklicher Vorteil dieser Interaktion mit dem Entzündungssystem des Körpers ließ sich klinisch bisher nur schwer beweisen¹³⁴.

Der Einsatz von Steroiden in der Herzchirurgie wird bisher weiterhin kontrovers diskutiert, ein neuroprotektiver Effekt konnte bisher noch nicht bewiesen werden. Als sogenannte „high-dose“ Therapie zur Neuroprotektion werden 30 mg/kg Körpergewicht intravenös als Dosis in der Literatur angegeben.

Eine Studie von Langley et al. wies vor kurzem bei einer Behandlung mit hochdosiertem Methylprednisolon durch die Verbesserungen des zerebralen Blutflusses und der Oxygenation nach 60 Minuten KSTH auf eine neuroprotektive Wirkung hin. Auch hierbei fehlte jedoch eine histologische Evaluation post mortem, die notwendig wäre, um wirklich einen neuroprotektiven Effekt beschreiben und quantifizieren zu können²⁰. Einzig die Annahme, dass die Verbesserungen der Perfusion und Oxygenation so kurz nach KSTH

wirklich ein Anzeichen für das Vorliegen einer neuroprotektive Wirkung darstellen, sollte diskutiert werden und stellt sich vor allem bei KSTH von nur 60 Minuten als fragwürdig dar ^{17;135}.

Eine Arbeitsgruppe der Duke-Universität berichtete ebenfalls vor kurzem über eine dramatische Reduktion der Immunantwort nach der Vorbehandlung mit hochdosierten Steroiden 8 Stunden vor der CPB, verglichen mit der herkömmlichen intraoperativen Applikation in der Primeflüssigkeit ¹³⁶. Die präoperative Applikation führte zur einer verbesserten Lungenfunktion durch verminderte pulmonale Wasserakkumulation. Eine ähnliche Wirkung im Gehirn durch Reduktion des perivaskulären Ödem und eine Verbesserung der zerebralen Hämostase kann vermutet werden. Andersen et al beschrieben in einer klinischen Studie eine Reduktion der Komplement-Aktivierung während CPB unter einmaliger intravenöser „high-dose“ Steroidtherapie. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im klinischen Outcome ¹³⁷. Im Gegensatz zu dieser Studie zeigten Boscoe et al, dass weder Steroide noch pulsatile HLM-Fluß die Komplement-Aktivierung beeinflussen ¹³⁸. Karlstadt et al. untersuchten den Einfluss der Steroide auf eine Endotoxin-Entstehung während CPB und stellten fest, dass Methylprednisolon die Entstehung des Plasma-Endotoxin als Faktor einer Alteration der Endothelfunktion nicht beeinflusst ¹³⁹.

Seit kurzem wird auch durch klinische Studien auf eventuelle Nebenwirkungen einer Steroidtherapie hingewiesen, gerade im Bereich der postnatalen Steroidapplikation. Die Indikation der postnatalen Steroidgabe ist meist eine Lungenunreife. Es konnten Störungen der neurologischen Entwicklung und des Verhaltens nach Steroidgabe beobachtet werden. Eine Meta-Analyse aus Kanada zeigte den Zusammenhang auf zwischen neurologischen Störungen und postnataler Steroidapplikation ¹⁴⁰.

1.5.2 Wirkungsmechanismus Steroide

Für den Wirkungsmechanismus der Steroide wird die Existenz eines Glucocorticoidrezeptor (GR-I) und ein Mineralcorticoidrezeptor (GR-II) mit einer unterschiedlichen zellulären Wirkung und mit einer unterschiedlichen Affinität der endogenen und exogenen Steroide für diese beiden Rezeptoren beschrieben.

Für den Glucocorticoidrezeptor I, den „klassischen“ Steroidrezeptor, existieren eine α - und β -Isoform. Dabei ist nur die α -Isoform in der Lage, durch Bindung der Steroide die entsprechende Wirkung zu entfalten. Die β -Form interagiert nicht mit den Steroiden und ist als Antagonist der α -Isoform bekannt ¹⁴¹. Der Steroidrezeptor (GR-I) ist im Zytosol lokalisiert und ein 770 Aminosäuren langes Protein, mit einem MG von 94000 Dalton. Er verfügt über einen Hitze-Schock-Protein abhängigen Aktivierungszustand, wobei der GR-Ia durch die Bindung an HSP 90 inaktiviert ist ¹⁴². Die Rezeptorenverteilung und Dichte hat einen erheblichen Einfluss auf die Steroidwirkung. So konnten im Gehirn regionale Unterschiede der Rezeptorendichte, der Wirkungsintensität und somit auch regionale Unterschiede in dem protektiven Effekt einer Steroidapplikation nach Ischämie aufgedeckt werden. Vor allem der Hippocampus verfügt über eine besonders hohe Dichte der Steroidrezeptoren ^{143;144}.

Die Wirkung der Steroide via Steroidrezeptor (SR) bewirkt vor allem eine Beeinflussung von intrazellulären und mitochondrialen Zielgenen mit der Beeinflussung der Proteinsynthese ¹⁴⁵. Im Zellkern kann der

aktivierte Steroidrezeptor die Gen-Transkription dann auf zwei unterschiedliche Arten modulieren: durch Transaktivierung und durch Transrepression. Bei der sogenannten Transaktivierung binden die Steroide an den zytoplasmatischen Steroidrezeptor, welcher dann in Kontakt mit dem Zellkern durch eine sogenannte „Glucocorticoid-Rezeptor-Einheit“ tritt. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung und Transkription der steroid-responsiven Gene mit daraus resultierender Produktion metabolisch und kardiovaskulär wirksamer Proteine. Die DNA-Sequenz in der Promoterregion, an welche der aktivierte Steroidrezeptor bindet nennt sich Glucocorticoid-Response-Einheit (GRE) ¹⁴⁶. Die Proteine, welche durch diesen Mechanismus vermehrt produziert werden, sind unter anderem das Interleukin-10, der Interleukin-1 Antagonist, das Lipocortin und Endopeptidasen ¹²⁸. Über diesen Mechanismus werden auch spannungsgesteuerte Ionenkanäle reguliert, es folgt eine Interaktion mit der Signalkaskade der Neurotransmitter und es kommt ebenso zu der Beeinflussung von Pumpen und Transportern der Zellmembran, welche den Ionen-Gradienten der Zelle und damit das Zellmembranpotential aufrecht erhalten ¹⁴⁷. Die Transaktivierung von Genen führt über den gleichen Mechanismus ebenfalls zu einer Induktion von metabolischen Genen, was wiederum eher zu einer unerwünschten Wirkung führt, wie z.B. der Erhöhung des Blutzuckerspiegels und der freien Fettsäuren, einer katabolen Proteinwirkung, einer Freisetzung von Neurotransmittern und einer Stimulation des kardiovaskulären Systems ^{121;128}.

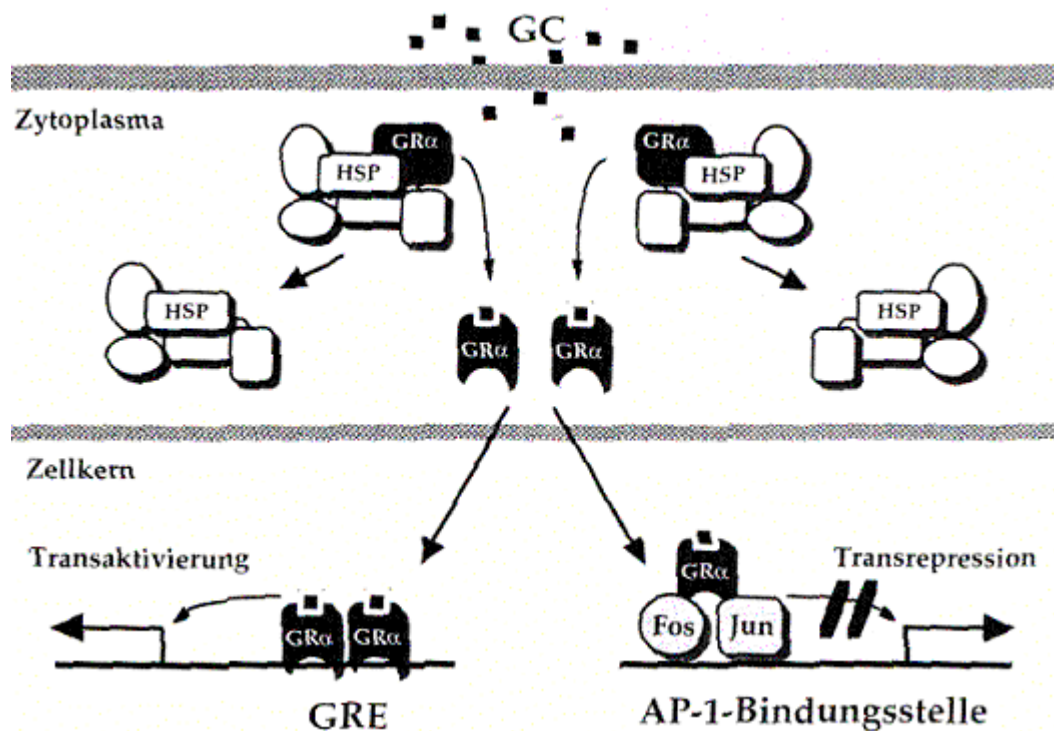


Abbildung 1-4: Zellulärer Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide

Dargestellt ist die Permeation des Glucocorticoides (GC) in das Zytoplasma und die Interaktion mit dem Glucocorticoidrezeptor (GR-Iα), welcher vorher einen Komplex mit Heat-Shock-Proteinen (HSP) bildet und zur Dissoziation dieses Komplexes führt. Der aktivierte Glucocorticoidrezeptor tritt dann in den Zellkern über und führt dort entweder durch Interaktion mit der DNA am Glucocorticoid-Response-Element (GRE) zur Transkription von Zielgenen. Eine weitere Wirkung des aktivierten GR ist die „Transrepression“, wobei es durch Hemmung von Transkriptionsfaktoren wie FOS und JUN und durch eine Interaktion mit dem Aktivator Protein 1 (AP1) zur Hemmung der Genexpression und auch zu einer Induktion der Apoptose kommen kann.

Die Transrepression bewirkt eine Hemmung der Genexpression und Proteinsynthese, wie z.B. von Interleukinen aus der Entzündungskaskade und führt damit zu einer immunsuppressiven Wirkung. Diese Wirkung scheint durch eine Interaktion der „Glucocorticoid-Rezeptor-Einheit“ mit den für die Interleukine spezifischen aktivierten Transkriptionsfaktoren (Nuclear factor-kappa B, Aktivator protein-1 oder auch Fos und Jun) stattzufinden, welche die Genexpression dieser inflammatorischen Proteine regeln^{126;128}. Es wird ebenfalls angenommen, dass es über diese Transrepression auch zur Induktion der Apoptose kommen kann, was bisher in Lymphozyten nachgewiesen werden konnte^{148;149}. Almeida et al. konnten sogar zwischen einer Apoptose-Induktion via Glucocorticoid-Rezeptor (GR-I) und eine neuroprotektiven Wirkung via Mineralcorticoid-Rezeptor (GR-II) differenzieren, dabei scheint die Wirkung vom Einfluss auf das Tumor-Supressor-Gen p53 abhängig zu sein, denn unter Glucocorticoidwirkung kam es zu einer Erhöhung und unter Mineralcorticoid-Einfluss zu einer Erniedrigung des p53¹⁵⁰. Es zeigt sich somit eine sehr vielfältige und komplexe Wirkung der Steroide, wobei die zerebrale Wirkung durch die regional unterschiedliche Verteilung der Steroidrezeptoren, durch die unterschiedlichen molekularen Mechanismen und verschiedenen genetischen Aktivitäten, durch die Beeinflussung des Zellmetabolismus und durch die Besonderheiten im Neugeborenenalter, von vielen unterschiedlichen Faktoren abhängig zu sein scheint.

2 Herleitung der Aufgabenstellung

Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (KSTH) ist heutzutage eine sehr wichtige Methode für die operative Korrektur angeborener und sehr komplexer Herzvitien, wie des HLHS, im Neugeborenen- und Kleinkindalter. Bei verbesserter Technik und Überwachung des Bypassregimes und deutlich verbessertem kardialen Outcome wird heute das Hauptaugenmerk auf die Detektion und vor allem Prävention von Alterationen der zerebralen Funktion, sowie auf die Vermeidung neurologischer Komplikationen und psycho- oder statomotorischer Alterationen gelegt.

Die Hypothermie ist eine wissenschaftlich belegte neuroprotektive Methode zur Erhöhung der Ischämietoleranz des Gehirns während Unterbrechung der systemischen Zirkulation. Jedoch zeigten einige Studien auf, dass es trotz der Anwendung der Hypothermie zu einer Alteration der neurologischen und psychomotorischen Entwicklung kommen kann^{33,151}. Ein wesentlicher Faktor dafür könnte ein noch vorhandener minimaler Metabolismus der Neurone sein, welcher auch in tiefer Hypothermie noch besteht und es dadurch im Kreislaufstillstand trotz Hypothermie zu einer Unterversorgung der Zellen des ZNS kommen kann.

Der derzeitige Stand der Wissenschaft lässt einen sehr großen Bedarf für die weitere Aufklärung pathophysiologischer Zusammenhänge zwischen CPB, KSTH und den Auswirkungen für das Gehirn vor allem im Neugeborenen- und Kleinkindesalter erkennen. Durch die aus klinischen Studien gewonnen Erkenntnisse über die zerebrale Auswirkung und die neurologische Symptomatik von Kindern nach kardialen Korrekturoperationen entstand der Bedarf zur Entwicklung einer neuroprotektiven Strategie. Die Möglichkeit mit einer geplanten pharmakologischen Intervention die Veränderungen eines möglichen globalen oder fokalen ischämischen Ereignis zu verbessern, wäre von besonderer therapeutischer Bedeutung. Doch mit welcher protektiven Maßnahme sich das multifaktorielle Geschehen verbessern ließe, bleibt weiterhin unklar. Und gerade das neonatale Alter stellt durch die Unreife der Organsysteme eine erhebliche Gefährdung für die Entstehung multipler neurologischer Defekte dar.

Ziel unserer tierexperimentellen Untersuchung am neonatalen Tier sollte zunächst die Erfassung von Form und Ausmaß der zerebralen Schädigung nach KSTH sein. Es sollten weiterhin zahlreiche Parameter untersucht werden, wie die Oxygenation, die Perfusion und der Metabolismus. Es sollte dann eine pharmakologische Intervention im Sinne neuroprotektiven Strategie mit Steroiden durchgeführt und verglichen werden. Der Einfluss einer unterstützenden neuroprotektiven pharmakologischen Intervention sollte in diesem tierexperimentellen Modell unter realistischen klinischen Bedingungen der Kinderherzchirurgie überprüft werden. Daher sollte sowohl die technische Ausstattung mit Oxygenatoren und der Herz-Lungen-Maschine, als auch die Führung von Narkose, Beatmung und alle kontrollierbaren physiologischen Parameter mit der klinischen Anwendung vergleichbar sein.

Anhand eines entwickelten tierexperimentellen Modells an neugeborenen Schweinen wollten wir die Veränderungen der zerebralen Perfusion und Oxygenation und das Muster der Neuronenschädigung be-

schreiben. Aufgrund unserer vorliegenden Erfahrungen aus vorangegangenen Versuchen mit Kaninchen und Ferkeln mit einer Bypasszeit von 60 Minuten, die bei gleichem Protokoll nach 6 Stunden postoperativer Überlebenszeit keine signifikanten neuronalen Veränderungen zeigten, verwendeten wir die doppelte Kreislaufstillstandszeit von 120 Minuten bewusst, um eine sichtbare zelluläre und histologisch nachweisbare Reaktion hervorzurufen und dann den Einfluss einer möglichen neuroprotektiven Intervention unter den Bedingungen des CPB und der Hypothermie durch Steroide analysieren zu können¹⁷. Die Dauer des KSTH liegt meist unter 120 Minuten. Jedoch können bei sehr aufwendigen operativen Korrekturen wie bei dem Hypoplastischen Linksherz Syndrom Stillstandzeiten von 60–100 Minuten erreicht werden. In der Literatur gibt es einige experimentelle Studien, die mit 80-120 Minuten deutlich längere KSTH-Zeiten angewandt haben, wie z.B. Bokesch et al., Ye et al., Fessatidis et al. und Nagashima et al.^{77 87 50 152}.

Es wurde daher ein standardisiertes Protokoll für ein neonatales Schweinebypassmodell mit anästhesiologischem Management, CPB und mit einer Periode von 120 Minuten Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie entwickelt, wobei die Tiere per Zufall vorher entweder einer Vorbehandlung mit Steroiden unterzogen wurden oder als Kontrollgruppe fungierten. Die Gruppenzugehörigkeit war während der Versuchsdurchführung nicht bekannt.

Die Entscheidung für eine Behandlung mit Steroiden fand aufgrund der klinischen Anwendbarkeit statt und weil Steroiden schon standardisiert in der Kinderherzchirurgie bzw. in der Neurochirurgie klinisch eingesetzt werden.

Ziel des Versuchs war die Evaluation des neuroprotektiven Effekts hochdosierter Steroide auf einen Ischämie-Reperfusionsschaden. Bei der Intervention mit Steroiden sollte außerdem die Abhängigkeit der Applikation und somit auch der Zusammenhang einer protektiven Steroidwirkung von der Permeation über die Blut-Hirn-Schranke geprüft werden. Daher wurde die präoperative Applikation der Steroide systemisch (intravenös) und intrathekal, mit direkter Applikation in den Liquorraum, nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt. Die Gehirne wurden blind standardisiert und umfassend histologisch und immunhistochemisch untersucht.

3 Methodik

3.1 Tierexperimentelle Untersuchung

Es wurde ein tierexperimentelles Modell in Zusammenarbeit mit Herzchirurgen, Kardiotechnikern und Anästhesisten entwickelt, mit dem Ziel, ein möglichst eng an der Klinik orientiertes Protokoll einzusetzen und sowohl die technischen Mittel, als auch die Prozeduren, möglichst realistisch und originalgetreu umzusetzen.

Die quantitative morphologische Beurteilung neuronaler Veränderungen wurde nach dem Versuch durchgeführt, bei gleichzeitiger Messung hämodynamischer, serologischer und metabolischer Parameter während des Versuchs. Diese Ergebnisse wurden zueinander in Beziehung gesetzt.

3.2 Versuchsgruppen

3.2.1 Art der Versuchstiere

Es wurden 50 neonatale Schweine mit einem Körpergewicht von $2.300 \pm 200\text{g}$ und einer durchschnittlichen Lebenszeit von 5,8 Tagen verwendet. Für die Versuche galten die entsprechenden Vorschriften der Tierschutzverordnung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales in Berlin mit der Genehmigungsnummer G0146/98. Sie wurden durchgeführt in der tierexperimentellen Einrichtung des Forschungshauses der Charité' Campus Virchow unter Anleitung des Tierschutzbeauftragten der Charité', Herrn PD Dr. Grosse-Siestrup, und mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. vet. M. Meissler.

Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet:

3.2.2 Kontrolltiere

Zwölf Tiere ohne Vorbehandlung (Kontrolle) wurden einem cardiopulmonalem Bypass (CPB) mit 120 Minuten Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (KSTH) unterzogen, mit anschließender Reperfusion und Erwärmung und einer postoperativen Überwachungsphase von mindestens 6 Stunden.

3.2.3 Vorbehandlung mit systemischer Methylprednisolongabe

In dieser Gruppe wurden 7 Tiere jeweils 4-6 Std. vor Beginn des Bypasses mit 30 mg/kg Methylprednisolon (Urbason solubile 32, Hoechst, Frankfurt) intravenös per Kurzinfusion behandelt. Die Tiere wurden dann einem CPB mit 120 Minuten KSTH in tiefer Hypothermie ausgesetzt. Anschließend erfolgte Reperfusion und Erwärmung und postoperativ 6 Stunden intensivmedizinische Überwachung.

3.2.4 Vorbehandlung mit intrathekaler Methylprednisolongabe

Fünf Tieren wurden 30 mg/kg Methylprednisolon (Urbason soluble 32, Hoechst, Frankfurt) intrathekal 4-6 Stunden vor Beginn des Bypasses nach steriler lumbaler Punktion mit einer Spinalnadel (Terumo Spinal Needle, Japan) verabreicht. Die Tiere wurden dann einem CPB mit 120 Minuten KSTH in tiefer Hypothermie ausgesetzt. Anschließend erfolgte Reperfusion und Erwärmung und postoperativ 6 Stunden intensivmedizinische Überwachung.

3.3 Versuchsablauf

3.3.1 Prämedikation

Zum Versuch wurden 50 neugeborene Schweine mit einem Gewicht von 2.300 ± 200 g und einem Alter von 5-9 Tagen verwendet. Sie wurden am Tag des Versuches von einem Bauern aus Brandenburg geliefert und von unserem Tieranästhesist Herrn Dr. M. Meissler innerhalb einer Stunde nach Ankunft intramuskulär (i.m.) mit 50 µg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke-Davis GmbH, Berlin) und 2 mg/kgKG Dormicum prämediziert.

3.3.2 Anästhesie und OP-Vorbereitung

Während der gesamten Zeit erfolgte die perioperative Überwachung mit Hewlett Packard OP-Monitoring System (HP Modell 66S) für EKG und HF, MAD, ZVD, O₂-Sättigung, und weitere invasive Druckmessungen.

Es wurden zu Beginn EKG-Elektroden, periphere Pulsoximetrie und eine rektale Temperatursonde angebracht. Die linke und rechte Ohrvene wurden für zwei intravenöse Zugänge punktiert. Anschließend folgte nach Präoxygenierung die orale-endotracheale Intubation und der Anschluss an die maschinelle druckkontrollierte Beatmung (Dräger Babylog Ventilator, Hamburg) mit einem Druck von 15 – 20 mmHg, einer Frequenz von 20-30/min und einer FIO₂ von ca. 21-30 %. Für die Narkose wurde eine total-intravenös Anästhesie (TIVA) mit 50 µg/kg/min Fentanyl (Curamed, Pharma GmbH, Karlsruhe) und 0,2 mg/kg/min Dormicum eingesetzt. Eine Relaxierung erfolgte mit 0,1-0,2 mg/kg Pancuronium (Curamed, Pharma GmbH, Karlsruhe) bedarfsorientiert. Die präoperative Lumbalpunktion wurde mit einer Spinalnadel (TERUMO spinal needle 22G) durchgeführt und es wurde maximal 0,5-0,7 ml klare Liquorflüssigkeit tröpfchenweise in sterile Kryo-Röhrchen (Cryovial, Carl Roth GmbH-Co, Karlsruhe) asserviert und sofort bei –80°C eingefroren.

Körperoberfläche		qm	0.16-0.18
Anästhesie	Fentanyl	µg/kg/h	50
	Dormicum	mg/kg/h	2
	Pancuronium	mg/kg	0,2
Beatmung	Frequenz	1/min	30-40
	FIO ₂	%	30 bis 100
	PEEP	mmH ₂ O	5 bis 10
	Inspir. Druck	mmH ₂ O	10 bis 25
Diurese	Vor	ml/kg/min	2
	Nach	ml/kg/min	2
HLM	Vollblut-Priming	ml	360
	Minimale Temp	°C	15
	Höchste ACT	sek.	400
	Total Heparin	IE	2500
	HLM-Fluß	ml/kg	250
Medikation	Dopamine	µg/kg/min	5 bis 10
	Protamine	ml	2,5
	Adrenaline	mg/kg	0,1
	Lasix	mg/kg	1-2

Abbildung 3-1: Anästhesie und Beatmung

Es wurde ein standardisiertes Protokoll für Anästhesie, Beatmung und Medikation eingesetzt.

Für kontinuierliche Urinsammlung erhielt das Tier einen suprapubischen Blasenkatheter. Dann wurde das Versuchstier für die Operation vorbereitet und in Rückenlage fixiert. Die Wärmeerhaltung bei einer Temperatur von 38.2 ° C erfolgt mittels Wärmematte (THERMOMAQUET) und Wärmelampe (HAE-RAUS: SOLLUX 500).

Unter sterilen Bedingungen wurde in Seldinger-Technik jeweils ein arterieller Zugang (BRAUN Abbot) in der A. femoralis und ein zentralvenöser Zugang (ZVK) in der Vena femoralis gelegt,. Es wurde ebenfalls eine retrograde Katheterisierung der Vena jugularis interna für die kontinuierliche Blutabnahme aus dem gemischt-venösen Rückstromgebiet des Gehirns durchgeführt. Es wurden an alle Gefäßkatheter die entsprechenden Druckmessungen installiert, um MAD, ZVD und die Drücke im zerebrovenösen Rückstrom der V. jugularis kontinuierlich zu messen. Der OP-Monitor (HP Modell 66S) ermöglichte ebenfalls die kontinuierliche Überwachung aller Vitalparameter wie Herzfrequenz, Arterieller Blutdruck, ZVD, Druck im Bulbus jugularis, periphere Sättigung, rektale Temperatur, EtCO₂, Atemfrequenz. Während des Versuchs erfolgte eine kontinuierliche Überwachung und Registrierung der Blutgase und der Elektrolyte mit einer Blutgas-Analyse (BGA) durch ABL (RADIOMETER Kopenhagen) und eine Messung des Hämoglobins und Hämatokrits durch Hämoximeter OSM3 (RADIOMETER Kopenhagen). Die Werte wurden jeweils simultan für das arterielle und venöse Blut, sowie für das Blut des zerebralen Rückstromes (Vena jugularis int.) bestimmt. Außerdem erfolgte eine Blutzucker-Überwachung mit Haemo Glukotest 20 –800 R (BOEHRINGER).

3.3.3 Herz-Lungen-Maschine (HLM)

Wir benutzten eine nicht-pulsatile Multiflow Rollerpumpe (STÖCKERT/SHILEY, Deutschland) mit dem dazugehörigen Wärmeaustauscher für Normo- und Hypothermie (STÖCKERT, Deutschland).

An die HLM waren ein Air –Oxygen-Mixer (SECHRIST) angeschlossen und ein ¼ Zoll Polytrode - Sensor mit Messgerät (POLYSTAN, Vaerlose, Dänemark) für die Messung der Sättigung und Temperatur in der arterielle Linie. Zusätzlich wurde eine arterielle Druckmessung (TELOS MEDICAL CORP.) mit automatischer Pumpenabschaltung bei hohen Drücken installiert und die Gerinnungshemmungsüberwachung mit Hilfe der aktivierten Klottungszeit ACT (HEMOCHRON), wobei während des CPB eine ACT von größer als 400 Sekunden aufrecht gehalten wurde. Als Pumpenschlauch verwendeten wir einen Silikon Schlauch (1/4 x 3/32 Zoll Pumpensegment WIPAK MEDICAL), und eine ¼ Zoll PVC-Tischlinie (MEDOS, Stolberg), mit jeweils angeschlossener 8 FR arterieller Kannüle (JOSTRA, Hirrlingen) und 14 FR venöse Kannüle (MEDTRONIC, USA). Zusätzlich verwendeten wir einen 40 µm arteriellen Filter für Neugeborene (DIDECO, Miranduly, Italy). Als Oxygenator verwendeten wir einen Safe Micro Neugeborenen Oxygenator (POLYSTAN, Vaerlose Dänemark) mit integriertem 40 µm Kardiotomie-Sauger Reservoir.

3.3.4 Priming

Das Priming der Maschine wurde durchgeführt mit ca. 400 ml Vollblut, wobei es sich um Spenderblut von einem Tier der gleichen Rasse meist vom gleichen Tag handelte, aufbewahrt in einem Bluttransfusionsbeutel (BIOTRANS, Dreireich) mit Gerinnungshemmung durch Na-Citrat und mit einer prophylaktischen Antibiotika-Gabe Cefotiamhydrochlorid (Spitzef, Takeda Pharma GmbH, Aachen) in einer Dosierung von 100 mg/kg KG. Dieses sogenannte „Vollblutpriming“ wurde mit zusätzlich 30-50 ml HAES 10%ig (FRESENIUS), 2500 IU/L Heparin (BRAUN), 20 ml Isotonische Kochsalz -Lsg (BRAUN) und bei Bedarf Natriumbicarbonat. Das Priming besaß dann einen Hämoglobingehalt von ca. 9.0 ± 1.0 g/dl mit ausgeglichenem physiologischen Säure-Basen Haushalt von 7.40 ± 0.05 erzielt wurde.

3.3.5 Thorakotomie

Der Zugang zum Herzen erfolgte mittels mediane Thorakotomie unter großer Vorsicht vor Verletzung der Thoraxgefäße und der umgebenden Organe. Nach mechanischer Spreizung des Thorax und der durchgeführter Blutstillung, erfolgte unter Sicht die Präparation von Perikard, Pleura und der großen Gefäße. Das Perikard wurde geteilt und alle Herzkompartimente, sowie Aortenbogen und A. pulmonalis wurden zugänglich gemacht. Die Kanülierung erfolgte in der Aorta ascendenz nach Inzision mit einer 8 FR Aorten-Kanüle und in das rechte Herzhorn mit einer 14 FR venösen Kanüle. Die Kanülen wurden mittels Tabaksbeutelnaht fixiert. Dann erfolgte der Anschluss der Kanülen an die Tischlinie und damit die Verbindung zu der HLM, wobei das gesamte System entlüftet wurde.

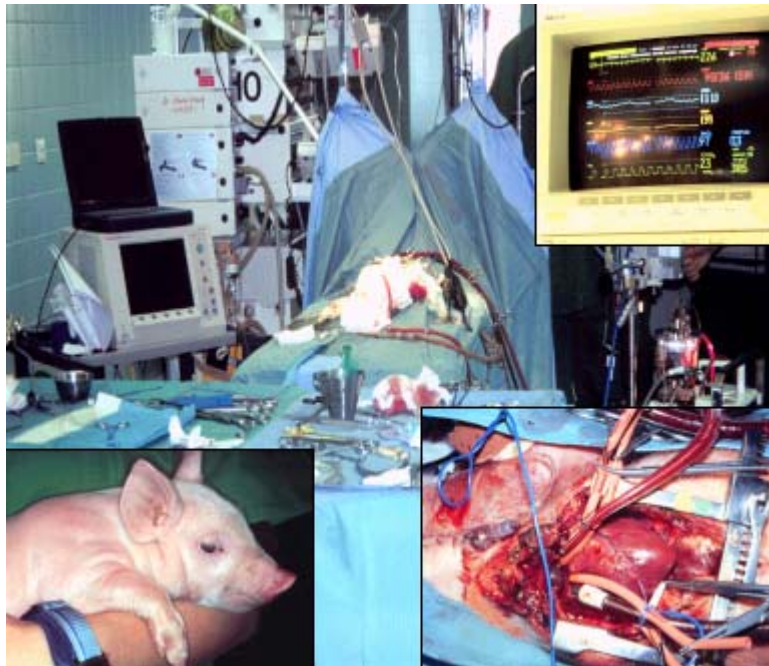


Abbildung 3-2: Versuchsabbildung mit HLM

3.3.6 HLM-Regime

Wir benutzten einen CPB mit vollem Fluss („full-flow-CPB“), d.h. mit einem einen Maschinenfluss von 250 ml/kg KG. Ein alpha-stat-Management für die Blutgase wurde angewendet mit für die jeweilige absinkende Temperatur unkorrigierten PCO₂- und pH-Werten. Die Bypasszeit war standardisiert unterteilt in eine Phase des normothermen CPB bei 38,0 ± 0,5 °C von 20 Minuten, mit darauffolgender Kühlungsphase über einen Zeitraum von 30 Minuten, mit einem Temperaturgradienten von maximal 9,0 ± 0,8 °C zwischen Bluttemperatur und Oxygenator, bis zum kälteinduzierten Herzstillstand bei 15 ± 0,5°C myokardialer Temperatur, welches durch ein EKG ohne jegliche elektrische Aktivität symbolisiert wurde. Nach dem Erreichen einer rektalen Temperatur von 15 ± 0,3 °C und einer peripheren Temperatur von 16°C, folgte dann die Phase des Kreislaufstillstandes in tiefer Hypothermie für 120 Minuten¹⁵³. Zusätzlich zur systemischen Kühlung durch die HLM benutzten wir die oberflächliche Myokard-Kühlung mit sogenanntem „Sludge“-Eiswasser, das eine myokardialen Temperatur unter 15 °C während des KSTH gewährleistete.

An den Kreislaufstillstand schloss sich dann die Phase der Reperfusion und Erwärmung an, dabei wurde in den ersten Minuten nur mit einem geringen Perfusionsfluß erwärmt bei einem Temperaturgradienten von 9 °C am Oxygenator, bis zum Erreichen einer myokardialen Erregung im EKG bei einer Myokardtemperatur von ca. 20°C und einer beginnenden myokardialen Bewegung. Nach beginnender Herzaktion nach ca. 3- 5 Minuten wurde der Perfusionsfluss stetig gesteigert bis der volle HLM-Fluss von 250 ml/kg erreicht wurde. Dabei wurden zum Erreichen eines optimalen Perfusionsregime der arterieller Mitteldruck im Bereich von 60 ± 10 mmHg gehalten und der ZVD bei 5 ± 1 mmHg. Wir erwärmten dann insgesamt bis zur physiologischen Temperatur von 38 ± 1° C über eine Phase von 45 – 50 Minuten, worauf dann

nach venösem Anstauen und gleichzeitiger Flussreduktion der HLM der cardiopulmonale Bypass beendet wurde.

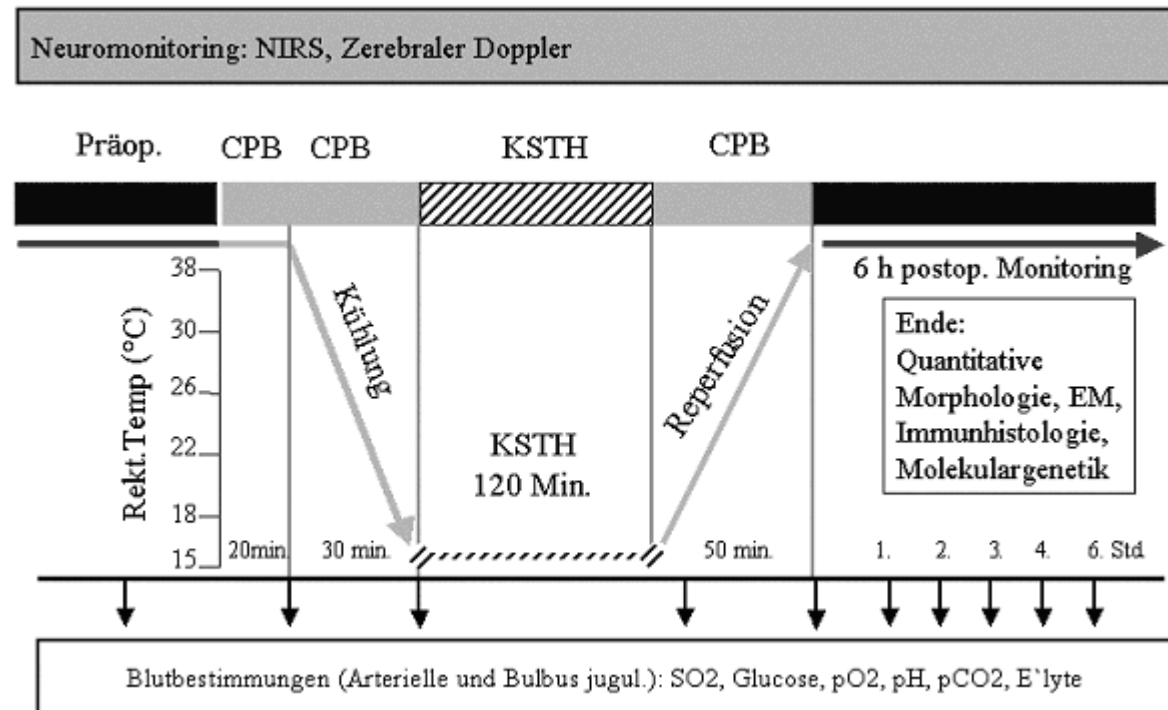


Abbildung 3-3: Versuchsprotokoll schematisch

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf mit der Temperatur und den einzelnen Phasen des cardiopulmonalem Bypasses (CBP) sowie der präoperativen und postoperativen Phase. Die standardisierten Blutentnahmen sind jeweils markiert, sowie die Liquorentnahme vor und am Ende des Versuchs.

3.3.7 Postoperative Phase

Nach Beendigung des CPB folgt eine mindestens 6-stündige postoperative Phase mit intensivmedizinischer Überwachung. Dabei wurden alle Parameter im physiologischen Bereich gehalten: Hämoglobin bei 10 ± 1 g/dl, der MAD bei 60-80 mmHg, der ZVD bei 5-7 mmHg. Die Partialdrücke für O₂ im Blut bei 100-150 mmHg und für CO₂ bei 30-40 mmHg wurden entsprechend durch die Blutgasanalysen stabil gehalten. Wenn notwendig wurde pharmakologisch mit Katecholaminen interveniert. Die Beatmung erfolgte bedarfsadaptiert und druckkontrolliert mit Beatmungsfrequenzen von 25-35/min, Atemzugvolumina von 30 bis 50 ml/kg, einem PEEP von 5-10cm H₂O, und Beatmungsdrücken von 30-40 mmHg. Postoperativ zeigten einige der Tiere Anzeichen einer pulmonalen Hypertension, welche jedoch durch die Beatmungsintensivierung beherrschbar war. Die Heparinisierung wurde mit Protamin antagonisiert, wobei 1ml 1000 IU Heparin neutralisiert. Eine Kontrolle erfolgte mittels ACT-Messung, die unter 160 sek. liegen sollte. Dann wurden die Tiere für sechs Stunden überwacht. Nach einem standardisiertes Protokoll wurden sämtliche Vitalparameter stabil gehalten, die Tiere blieben beatmet und narkotisiert.

3.3.8 Ende des Versuchs

Nach einer sechsstündigen postoperativen Phase unter stabilen hämodynamischen und metabolischen Bedingungen wurden die Tiere in Narkose geopfert. Dabei wurde bei stabilen hämodynamischen Verhältnissen das Herz entnommen, und innerhalb von 5 Minuten der dünne Schädelknochen medial gespalten, der Liquor aus der Zysterna magna und den Seitenventrikeln, sowie das Gehirn entnommen und das Hirngewicht ermittelt.

3.4 Morphologische Untersuchung des Gehirns

3.4.1 Einbettung

Das Gehirn wurden dann medial gespalten und die Hemisphären kamen zur Fixation für 48 Stunden in SOMOGYI-Lösung, eine Lösung aus gesättigter Pikrinsäure mit Paraformaldehyd und 25%igem Glutaraldehyd in PBS-Puffer¹⁵⁴, mit einem neutralem pH-Wert. Danach wurden aus der linken und rechten Hemisphäre standardisiert die Schnitte für die einzelnen Hirnregionen angefertigt, wobei jeweils circa 3 mm transversale dünne Schnitte der beiden Hemisphären für die Hirnregionen frontaler, parietaler, occipitaler Kortex, sowie der Bereich Stammganglien, Hippocampus, Kleinhirn und Medulla angefertigt und in Paraffin eingebettet wurden (siehe Abbildung 3-4). Die Paraffin-Blöcke wurden mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTS von Sigma code A/3648) aufbereitet, zugeschnitten mit dem Mikrotom in 6 µm dicke Schnitte für die histologische und immunhistochemische Färbung.

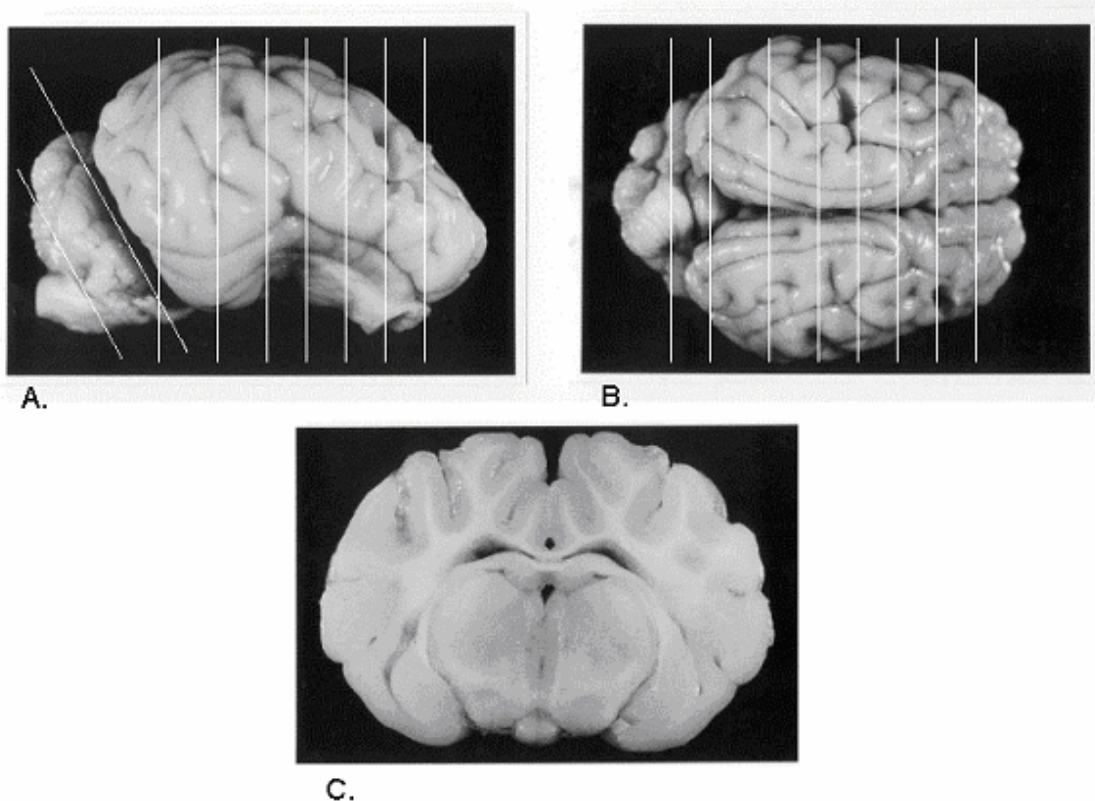


Abbildung 3-4: Standardisierte Präparation des Gehirns**3.4.2 Histologische Untersuchung**

Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte standardisiert und blind für die jeweiligen Versuchsgruppen in der neuropathologischen Abteilung der Freien Universität Berlin. Es wurden der Hippocampus, die Stammganglien mit Ncl. caudatus, Thalamus und Pallidum, der Cortex mit Gyrus cinguli, das Kleinhirn und die Medulla ausführlich untersucht. Die Färbung erfolgte mit Hämatoxylin und Eosin (HE)-Färbung und „Luxol fast blue“ (Markscheidenfärbung). Artefakte sogenannte „Dark neurons“ wurden ausgeschlossen nach Cammermeyer et al.¹⁵⁵. Speziell der Hippocampus als komplexes und hypoxieempfindliches Areal des Gehirns wurde detailliert analysiert und die Auswertung entsprechend seiner anatomische Unterteilung in die Regionen Cornu ammonis CA 1-4, Gyrus dentatus mit Area dentata und das Subiculum. Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde ein Olympus-Mikroskop eingesetzt und die photographische und digitale Dokumentation erfolgte mit einem LEICA Photomikroskop.

3.4.3 Immunhistochemie for Protein S-100B

Die immunhistochemische Färbung des calciumbindenden Proteins S-100-B wurde durchgeführt mit Hilfe monoklonaler Antikörper und der alkalischen Phosphatase Anti-Phosphatase (APAAP-Methode) nach Cordell et al. 1984¹⁵⁶. Die Schnitte wurden inkubiert mit dem primären monoklonalen Mause Antikörper (IgG von DPC Immustain, CKS1S) für 48 Stunden. Danach erfolgt die Zugabe des sogenannten Brückenantikörpers, ein Kaninchen-Anti-Mause-Antikörper im Überschuss und die Inkubation für 30 Minuten. Am Ende erfolgte dann die Zugabe des APAAP-complex 1:50 in TBS (Dakopatts, code D651), welcher an den Brückenantikörper bindet. Für die Visualisierung mittels der enzymatische Reaktion durch den Enzym-Antikörper-Komplex wurden DPC-Immustain-Streptavidin-Biotin-Immunperoxidase (DPC Immustain-kit) angewendet. Zwischen den Schritten muss die Spülung mit phosphatfreier Pufferlösung erfolgen.

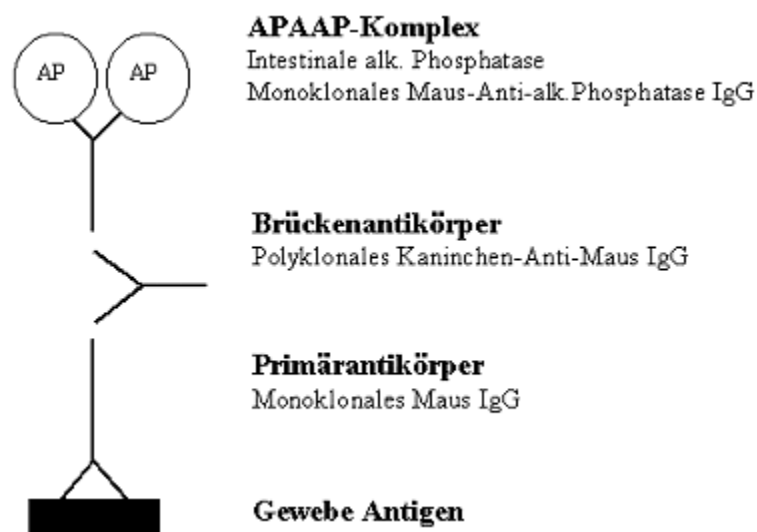


Abbildung 3-5: Immunenzytatische Färbung des Protein S100B

Alkalischen Phosphatase Anti-Phosphatase (APAAP) -Methode nach Cordell et al.

3.4.4 Detektion der Mikroglia mittels Lektin-Färbung

Es wurde versucht, eine mögliche inflammatorische Reaktion durch die Detektion der Mikrogliazellen mittels Lektin-Färbung nachzuweisen. Mikrogliazellen gehören zu der Familie der Monozyten/Makrophagen. Ihre Vorläufer wandern während der Embryonalphase in das ZNS ein und bilden dort das ortsständige Makrophagensystem. Die Zellen sind amöboid beweglich und mitotisch aktiv. Postnatal bilden sie Äste und Fortsätze aus und machen ca. 20% der Gliazelle im ZNS aus. Ein pathologischer Stimulus führt zu ihrer Aktivierung in eine mobile, phagozytierende und Zytokine/Proteasen sezernierende Zelle. Mikrogliazellen lassen sich mittels Immunocytochemie durch Bindung von Lektin und Metalimprägnation identifizieren. Die Mikroglia wurde in repräsentativen entparaffinierten Hirnschnitten mittels Biotinisiertes Tomato-Lektin von *Lycopersicon Esculentum* (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA 94010 USA, Charge Nr. M0503) in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:200 selektiv detektiert und in einer Feuchtkammer bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Weiterhin wurden TBS-Puffer zum Spülen und Trypsin (Sigma T7409) zum Andauen verwendet. Die Färbung erfolgte mit DAB (Sigma D 5905) für braun und Hämatoxylin für die blaue Kerndarstellung¹⁵⁷.

3.4.5 Quantifizierung der neuronalen Nekrose

Nekrotische Zellveränderungen wurden am mit HE-gefärbten Schnitt anhand der entsprechenden charakteristischen Veränderungen wie Eosinophilie, Verlust der Nissl-Substanz und anderer zytoplasmatischer Strukturen, sowie der Kernpyknose mit Basophilie identifiziert. Frühe Formen nekrotischer Veränderungen, wie intrazelluläre mitochondriale Schwellung und perineurales Ödem, ebenso wie späte Veränderungen in Form von Zellnekrose der Neurone konnten beobachtet und dokumentiert werden.

Insgesamt wurden die Hippocampus-Formation als ein Ort der selektiven Neuronenveränderungen^{88;158} umfassend analysiert und die Neuronenveränderungen quantitativ dokumentiert. Der Hippocampus wurde unterteilt in die anatomischen Regionen Cornu ammonis 1-4, Gyrus dentatus mit Fascia dentata und das Subiculum.

Die standardisierte histologische Auswertung erfolgte blind für alle Gruppen mittels lichtmikroskopischer computergestützter Quantifizierung durch interaktive Morphometrie, wobei in einer Fläche von 10 bis 40 mm² in den einzelnen Hirnregionen die nekrotischen Neurone klassifiziert und quantitativ der prozentuale Anteil dieser Neurone an der Gesamtzahl (500 ±70) aller gezählten Neurone errechnet wurde¹⁵⁹. Ebenfalls quantifiziert wurden die Veränderungen im Gyrus cinguli (GC) als Repräsentant des Neokortex, da der GC mit seinem Windungstal als besonders inert gegenüber einer artifiziellen externen Neuronenverletzung gilt. Im Bereich der Stammganglien wurden Nucleus caudatus und Kerne des Thalamus, sowie

das Kleinhirn analysiert und die nekrotischen Neuronenveränderungen quantifiziert. Dabei wurden im Kleinhirn vor allem die Veränderungen der Purkinje-Zellen registriert.

3.4.6 Detektion der Apoptose mittels spezifischer TUNEL-Färbung

Die apoptotischen Zellveränderungen wurden mittels TDT vermittelter-dUTP-Biotin-nick-end Labeling-Methode (TUNEL) und sogenannter in situ DNA-Fragmentation dargestellt.

Diese Färbung erfolgte an den mit Xylol und Ethanol entparaffinierten Schnitten. Dabei wurden die Schnitte mit Tris-Pufferlösung gespült, anschließend mit Proteinase K für 15 Min. inkubiert und erneut mit Tris-Pufferlösung gespült. Die Inkubation erfolgte mit in-situ-Tailing-Mix, welcher aus Digoxin-DNA mit Biotin-16-dUTP (Kat-Nr.1093979), sowie ca. 20µl/cm³ terminaler Transferase vom Kälber Thymus (Kat-Nr.220582) bestand. Weitere Bestandteile sind CoCl₂ 25mmol und Puffer (ROCHE Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten im Wärmeschrank. Darauf folgte eine erneute Pufferung und die Blockierung der unspezifischen Veränderungen mittels 10%iger FCS-Lösung für 15 Min. bei Raumtemperatur. Nach Anwendung von Anti-Digoxigenin-AP für 60 Minuten erfolgte die farbliche Entwicklung unter dem Mikroskop. Anschließend wurde noch die Gegenfärbung mit Kernechtrot und Aralsulfat für ca. 10 Minuten vollzogen.

Die apoptotische Veränderungen wurden ebenfalls im HE-Schnitt anhand der morphologischen Kriterien wie Chromatinkondensation, nukleäre Blasenbildung und Bildung sogenannter apoptotischer Körperchen („apoptotic bodies“) identifiziert und mittels einer Gitterplatte (OLYMPUS) quantifiziert ¹⁰⁶.

3.4.7 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Für die Elektronenmikroskopie wurden aus den SOMOGYI-fixierten Gewebe würfelförmige Anteile mit einer Kantenlänge von 2 mm, standardisiert für die Regionen Hippocampus, Gyrus cinguli, Stammganglien und Kleinhirn zugeschnitten und mit Osmiumtetroxyd nachfixiert. Nach Entwässerung wurde das Gewebe in Araldite eingebettet. Anschließend wurden Semidünnschnitte angefertigt und mit Toluidinblau angefärbt. Nach Mikroskopie der Semidünnschnitte wurden die Bereiche für die Ultradünnschnitte am Mikroskop lokalisiert und entsprechend markiert. Die Ultradünnschnitte wurden nach Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat im Elektronenmikroskop (ZEISS EM 10) mikroskopiert.

3.5 Molekulargenetische Untersuchung des Gehirns

Die Bestimmungen des Hitze-Schock-Proteins 70 kDa (HSP 70), der Apoptose-Peptide Bak und FAS, und der anti-apoptischen Peptide Bcl-xl aus der Bcl-2-Familie erfolgten mittels Real-time PCR in der molekular medizinischen Einrichtung des DHZB. Dabei wurde die RNA/DNA-Expression dieser im Zusammenhang mit der apoptotischen Kaskade stehenden Proteine ausgewählt, um einen eventuellen Effekt der Steroidintervention auf die Entstehung der Apoptose im Rahmen des KSTH von 120 Minuten molekulargenetisch zu untersuchen. Die Bestimmungen wurden am gefrorenen Hirnmaterial durchgeführt.

Dabei wurde aus dem frontalem Kortex unter Wahrung der Temperatur die benötigte Gewebemenge gewonnen, das Gewicht ermittelt und das Material weiter in flüssigem Stickstoff konserviert. Neben den drei Versuchsgruppen wurde auch noch die Bestimmung an Hirnproben von Tieren ohne jegliche Operation oder Eingriff (Sham-Tiere) durchgeführt, um Erkenntnisse über die normale Expression im Gehirn ohne den Einfluss einer Ischämie zu erhalten.

Aus dem Hirnmaterial folgte dann die standardisierte Aufbereitung der RNA mittels RNeasy-Kit von Quiagen. Dabei wurden nach standardisierter Aufreinigung und Bearbeitung aus den Schnitten die RNA Probe gewonnen. Die aufgereinigte RNA wurde dann für die weitere Bearbeitung bei -80°C konserviert. Danach wurde die Herstellung der komplementären DNA (c-DNA) durchgeführt, wobei aus der RNA dann mittels Reverser-Transkriptase (RT) nach Gibco Superscript II (Invitrogen) die komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) hergestellt wurde. Darauf folgte die Realtime-PCR mit der cDNA (GeneAmp 5700, Perkin Elmer) mit SYBR Green, wobei die cDNA dann mit dem jeweils spezifischen Primer für 18s, GAPDH, HSP70, Bcl-xl, BAK, FAS eingesetzt wurde. Die spezifischen Primer wurden mit Primer Express hergestellt und die Spezifität der Oligonuklotidsequenzen wurde mit BLAST möglichst Intron-überspannend kontrolliert und bestätigt. Durch die spezifischen Primer wurde dann die DNA des entsprechenden Genes in der PCR hochamplifiziert.

Es erfolgte die Denaturierung und Auftrennung der DNA bei einer Temperatur $> 92^{\circ}\text{C}$ mittels "Hot start" PCR. Dann die Primer Anlagerung (Annealing), wobei über einen Zwischenschritt im 1. Zyklus aus der Einzelstrang-DNA die entsprechende Doppelstrang DNA (ds-DNA) hergestellt. Darauf folgte dann pro Zyklus eine Verdopplung spezifischen Gensequenz für den jeweiligen Primer, wenn die PCR annähernd zu 100% verläuft. Insgesamt wurde in 30-40 Zyklen eine exponentielle Akkumulation des Primerzielbereichs durchgeführt, und somit pro PCR aus einer Matrize in z.B. 35 Zyklen 34×10^9 Kopien hergestellt wurden. Die Quantifikation der primerspezifischen DNA wurde während der PCR mittels Fluoreszenz-Detektion durchgeführt. Dabei wurde die Genexpressionsrate mittels SYBR Green analysiert, welches eine hohe Affinität zur Doppelstrang-DNA besitzt. Mit dem 5700 Sequenz-Detektor und dem Einsatz des SYBR Green konnte eine Echtzeit-Analyse der DNA-Vervielfältigung erhoben werden. Der 5700 Sequenz-Detektor besteht aus einer Halogen-Lichtquelle, welcher blaues Licht mit einer Wellenlänge von 485 nm durch einen optischen Filter emittiert. Das Licht wird durch eine Feldlinse auf die Probenfläche geleitet, und durch den an die DNA gebundenen Fluoreszenzfarbstoff wird das Licht mit der spezifischen Wellenlänge von circa 520 nm messbar. Während der gesamten Messzeit wird pro Zyklus ein Bild des emittierten grünen Lichts gespeichert, wobei die Emission des Lichts proportional zu der DNA Amplifikationsmenge ist. Da man am Anfang nicht weiß in welchem Verhältnis mit forward-Primer zu reverse-Primer das beste Primerverhältnis entsteht, wird als erstes eine Primer Matrix mit unterschiedlichen Primerverhältnissen ausgetestet. Am gängigsten sind die Verhältnisse 1:1; 1:3; und 3:1 des forward-Primers zum reverse-Primer. Dazu werden alle cDNA Proben, die untersucht werden sollen, „gepoolt“ (sogenannter Master-Pool). Nachdem das beste Primer Verhältnis für das jeweilige Gen ermittelt worden ist, macht

man eine Verdünnungsreihe aus diesem Pool der cDNA Proben, zur Erstellung der Standardkurve. Die mittleren cDNA Konzentration aller Proben wird dann in die PCR eingesetzt. Aus der PCR-Verdünnungsreihe wird dann eine Standardkurve generiert. Aus dieser ist ersichtlich, mit welcher Effizienz die PCR des jeweiligen Primerpaares gelaufen ist. Ist die PCR mit nahe zu 100% verlaufen kann man zur weiteren Analyse die Delta Delta CT (Threshold cycle) Methode anwenden.

Am Ende wurde die jeweilige Expression des entsprechenden Apoptose-Proteins bei den Tieren ohne jeglichen Eingriff auf einen Werte von eins gesetzt, und im Vergleich dazu die Expression bei den Versuchstieren graphisch dargestellt.

3.6 Statistische Methoden

Die Bearbeitung erfolgte mit MS-Office-Paket. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney Test und dem Programm Statview für Windows Version 5.0.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsgruppen

Die 24 eingeschlossenen Tiere der drei Versuchsgruppen waren sieben bis elf Tage alt und unterschieden sich präoperativ nicht signifikant in Körpergewicht und Größe (siehe Abbildung 4-1).

	Kontrolle	Systemisch MP	Intrathekal MP
Anzahl	12	7	5
Gewicht	2378 ± 147	2393 ± 143	2344 ± 137

Abbildung 4-1: Präoperatives Gewicht der eingeschlossenen Tiere

4.2 Morphologische Veränderungen im Gehirn

Die Gehirne zeigten eine dem Alter angemessene neuronale Entwicklung. In einigen Bereichen, vor allem aber um die Hirnventrikel, waren noch Matrixzellnester vorhanden. Alle drei Versuchsgruppen wurden hinsichtlich morphologischer Veränderungen blind beurteilt. Nur bei einem Tier konnte eine intraventrikuläre Blutung beobachtet werden, welches zum Ausschluss aus der Studiengruppe geführt hat. Es zeigten sich sonst keine Anzeichen einer intra-, periventrikulären oder intraparenchymatösen Blutung.

4.2.1 Entzündliche Veränderungen

In keiner der drei Gruppen traten entzündliche Veränderungen, wie Proliferation und Aktivierung der Mikroglia oder eine extravaskuläre Ansammlung von Leukozyten oder Lymphozyten auf. Eine perioperativ entstandene Infektion als mögliche Ursache für eine daraus resultierende Neuronenzellschädigung galt somit als nicht wahrscheinlich. Die Mikrogliafärbung beruht auf der Anfärbung von Lektinen (spezifische Zuckermoleküle), welche aber nicht nur auf den Mikrogliazellen zu finden sind, sondern auch auf den Endothelzellen. Daher färben sich die Endothelzellen ebenfalls braun an. Jedoch konnte in keinem Versuchstier eine Aktivierung der Mikrogliazellen detektiert werden. Als Vergleich ist ein Schnitt von einem Tier nach Trauma mit deutlicher Aktivierung der Mikroglia dargestellt.

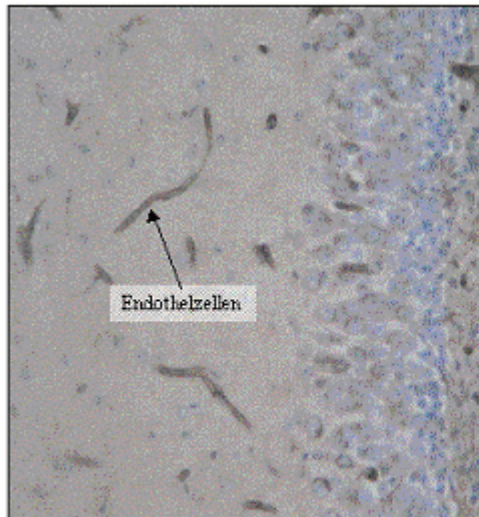


Bild A Studientiere

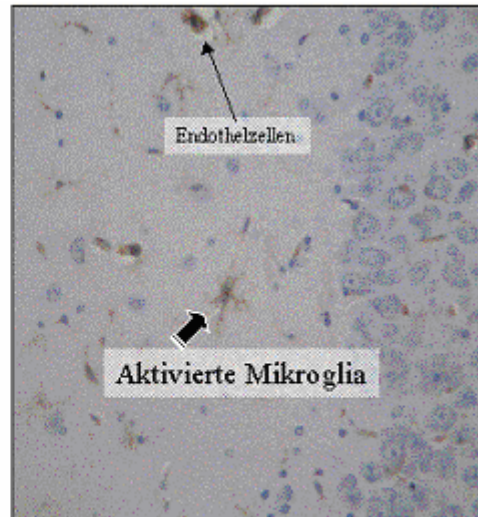
Bild B Gehirn mit aktivierter Mikroglia
(Kein Studientier)

Abbildung 4-2: Mikroglia-Detektion mittel Tomato-Lektin-Färbung

Abbildung A zeigt einen repräsentativen Schnitt aus dem Gehirn der Studiengruppen. Es konnte keine Aktivierung der Mikroglia nachgewiesen werden. Abbildung B zeigt zum Vergleich eine Tomatolektinfärbung bei einem Tier nach Trauma mit aktivierter Mikroglia, zu erkennen an den vielen sternförmigen Fortsätzen. Eine Microgliareaktion spielte somit im Zusammenhang mit CPB und KSTH in diesen Versuchen keine Rolle. Mit Tomato-Lektin färben sich auch die Endothelzellen positiv.

4.2.2 Veränderungen der Astrogliazellen

Bei allen Tieren konnte neben den morphologischer Veränderungen der neuronalen Zellen auch charakteristische Veränderungen der Astrozyten in Form einer deutlichen Schwellung der perivaskulären und astrozytären Endfüsse beobachtet werden. Mikroskopisch kam es zur Ausbildung eines ausgeprägten perivaskulären Ödems (siehe Abbildung 4-3 und 4-4).

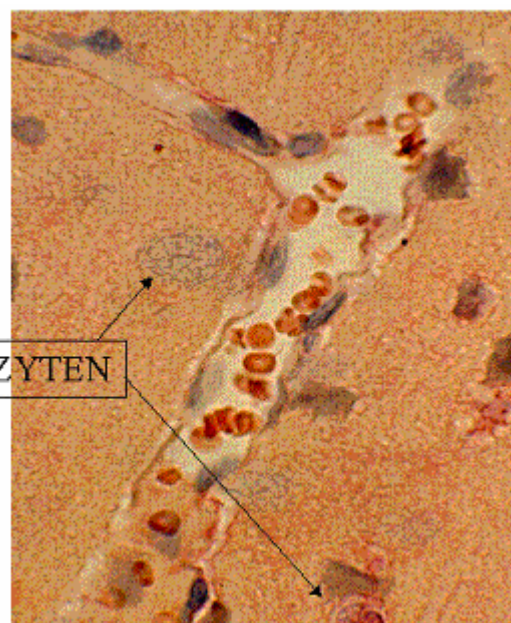
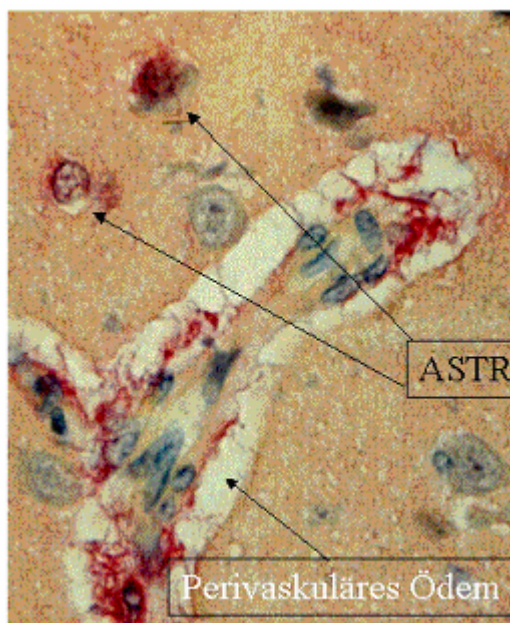


Abbildung 4-3: Perivaskuläres Ödem – Astrozytenfärbung mit Protein S100B

Deutlich zu erkennen sind die rot-gefärbten S-100B positiven Astrozyten. Umliegend sind gut erhaltene Neuronen zu erkennen, ohne ischämische Veränderungen. Das rechte Bild zeigt ein Kontrolltier ohne HLM oder OP. Die Veränderungen der Astrozyten gingen in der zeitlichen Abfolge den neuronalen Veränderungen voraus.

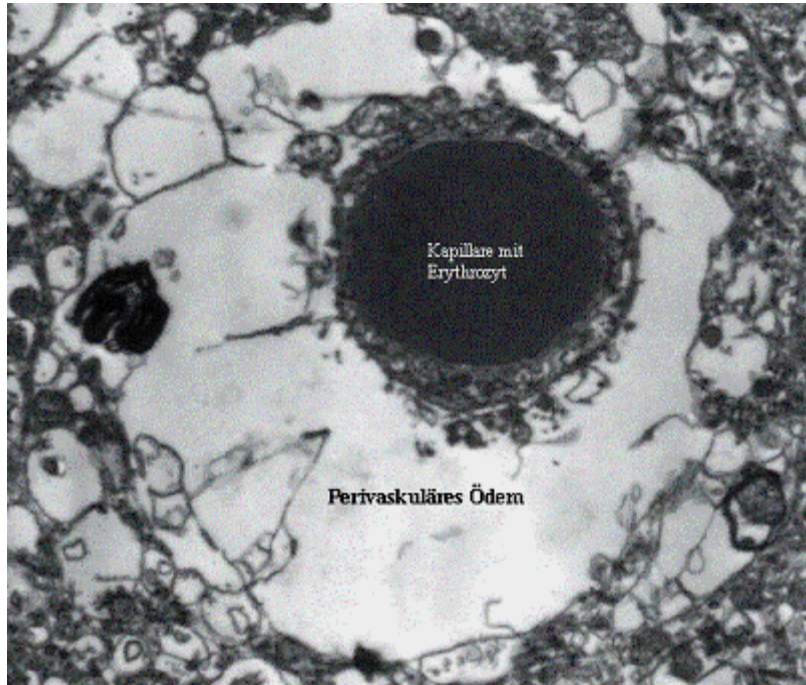


Abbildung 4-4: Perivaskuläres Ödem in der Elektronenmikroskopie

Die Abbildung zeigt einen Gefäßquerschnitt, umgeben von dem deutlich ödematös veränderten perivaskulären Raum, welcher durch die Endfüsse der Astrozyten gebildet wird.

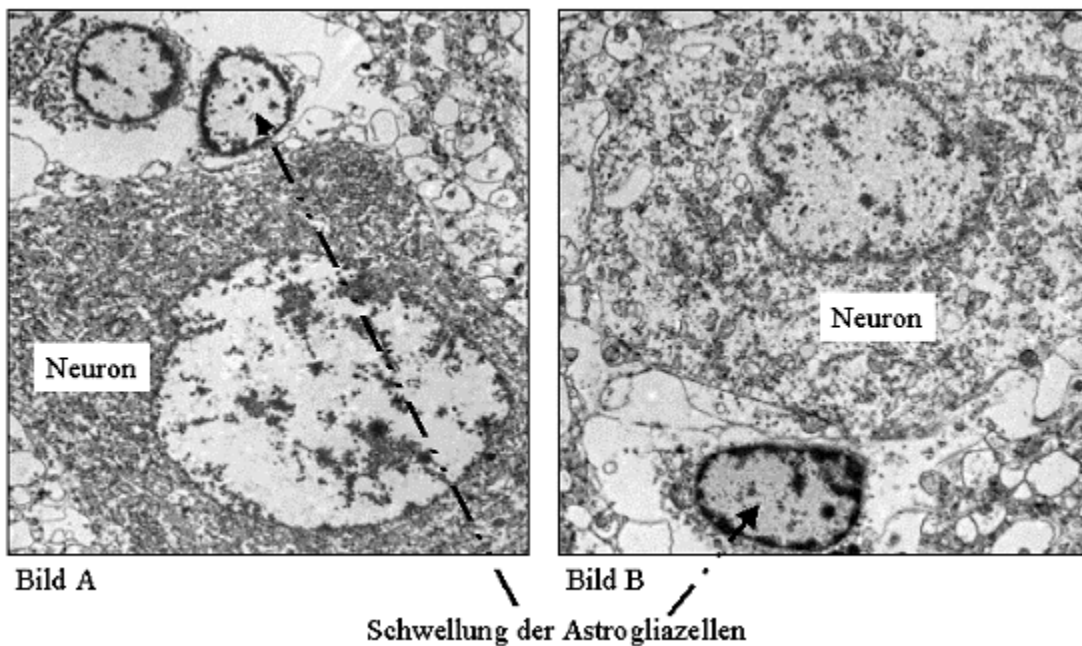


Abbildung 4-5: Astrozytäres Ödem in der Elektronenmikroskopie

Dargestellt sind jeweils ein Neuron mit einem Astrozyten. Dabei erkennt man, dass die Astrozyten ödematös verändert sind, während die Neuronen intakt sind.

Die Beurteilung des Ödems wurde quantitativ über die prä- und postoperative Gewichtsdifferenz durchgeführt. Eine Beurteilung aufgrund der morphologischen Erscheinung im Rahmen der lichtmikroskopischen Untersuchung fand ebenfalls statt. Das perivaskuläre Ödem war vor allem bei den kleineren Gefäßen, wie Arteriolen und Venolen am ausgeprägtesten. Die Lokalisation war dabei sehr unspezifisch und das perivaskuläre Ödem war in allen Bereichen des ZNS nachweisbar.

Zusätzlich zeigte sich neben dem perivaskulären Ödem auch eine perineurale Schwellung, welche aber erst mit zunehmender Überlebenszeit deutlicher ausgeprägt und erkennbar war.

4.2.3 Veränderungen der Neuronen im Hippocampus

Die morphologische Auswertung wurde für den gesamten Hippocampus unter Berücksichtigung seiner anatomisch-morphologischen Strukturen durchgeführt. Es zeigte sich im Vergleich zu früheren Studien, wie z.B. bei Ye et al mit experimenteller globaler Ischämie, dass der Fokus der nekrotischen Veränderungen nicht im Sektor CA 1 des Hippocampus, sondern auch im CA 4 liegt ^{98 99}.

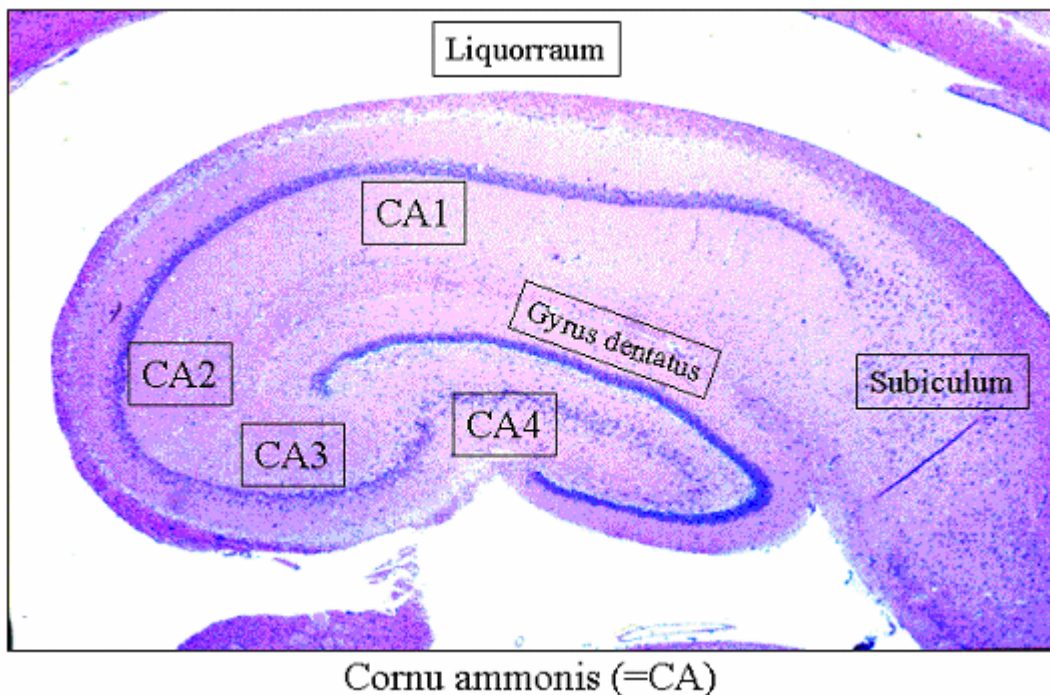


Abbildung 4-6: Untersuchte Regionen des Hippocampus

Hier sieht man einen Querschnitt durch den Hippocampus. Die einzelnen morphologisch und funktionell unterschiedlichen Regionen mit Cornu ammonis (CA) 1 bis 4, Gyrus dentatus und Subiculum sind dargestellt.

Die nekrotischen Neurone waren durch Eosinophilie, Kernpyknose, Zellschrumpfung sowie durch die Veränderungen der zytoplasmatischen Zellorganellen gekennzeichnet. Perineural und perivaskulär war

ein ausgeprägtes Ödem zu beobachten. Es gab regionale Unterschiede im Gehirn nach KSTH, wobei der Hippocampus sich als deutlich geschädigt erwies.

In der Kontrollgruppe war nach 120 min. KSTH ohne Einfluss einer Steroidbehandlung das Ausmaß der Nervenzelluntergängen in Form von Nekrose mit $77,56 \pm 10,32$ % im Bereich des Cornu ammonis 4 (CA 4) am größten. Ebenfalls eine ausgeprägte Nekrose konnte mit einem Anteil von $69 \pm 7,3$ % der Neuronen im CA 1 beobachtet werden. Die Veränderungen in den anderen Sektoren CA 2 und 3 waren nicht so ausgeprägt.

Im Gyrus dentatus zeigten sich nur vereinzelte nekrotische Neurone, es konnten zusätzlich aber auch einige vereinzelte apoptotische Veränderungen beobachtet werden.

4.2.4 Schädigungsmuster in den anderen Hirnregionen

Die neuronalen Veränderungen und das Schädigungsmuster im zerebralen Kortex, in den Stammganglien und im Kleinhirn werden im Zusammenhang Kapitel „Einfluss der Steroidintervention“ diskutiert und detailliert dargestellt. Nach KSTH zeigte sich, dass Cortex mit ca. 50 % neuronale Nekrose deutlich geringer betroffen ist. Neben der Nekrose traten auch vereinzelte Apoptosen der Gliazellen und Neurone auf. Die Stammganglien waren mit ca. 45 % Nekrose noch geringer geschädigt. Jedoch zeigte sich im Kleinhirn ein höheres Maß an neuronaler Nekrose, ca. 70 % der Purkinje-Zellen waren verändert. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse erfolgt weiter unten.

4.3 Einfluss der systemischen und intrathekalen Steroidbehandlung

4.3.1 Postoperatives Ödem

Zur Quantifizierung des entstandenen perioperativen Ödems nach 120 Minuten KSTH wurde unter anderem die prä- und postoperative Gewichts Differenz ermittelt. Dabei wurde auch die prozentuale Gewichtszunahme berechnet. Die prä- und postoperative Gewichts Differenz betrug nach CPB und 120 Minuten KSTH in der Kontrollgruppe 462 Gramm, dieses entsprach einer postoperative Gewichtszunahme von knapp 23 % gegenüber dem präoperativen Gewicht.

Die Prävention eines interstitiellen Ödems und die verminderte Einlagerung von Wasser durch eine hochdosierte Steroidapplikation sollte durch den Vergleich der prä- und postoperativen Gewichts Differenz ermittelt werden.

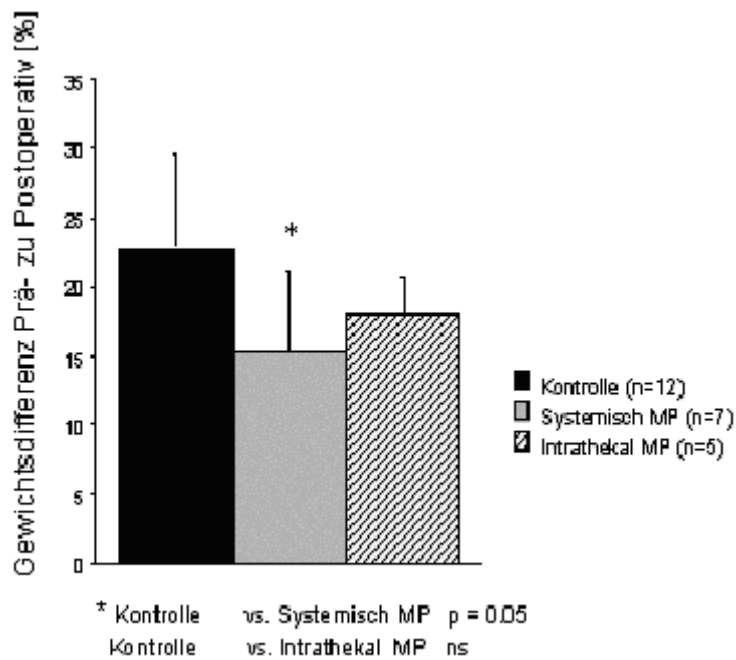


Abbildung 4-7: Postoperative Gewichtszunahme der Versuchsgruppen

*Zwischen den untersuchten Gruppen zeigte sich präoperativ kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht. Die postoperative Gewichtszunahme zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der systemischen Steroidgruppe (** $p < 0.05$). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der intrathekalen Steroidgruppe.*

Morphologisch zeigte sich zwischen den Gruppen jedoch auch ein Unterschied in der Ausprägung des Ödems. In der Kontrollgruppe war das Ödem morphologisch am stärksten ausgeprägt, in der systemisch behandelten Steroidgruppe am schwächsten.

4.3.2 Zerebrales Ödem

Das zerebrale Ödem konnte nur semiquantitativ über den Anteil des Hirngewichts vom Gesamtkörpergewicht erschlossen werden. Ein signifikanter Einfluss der Steroidgabe auf die Ödembildung war auch hier erkennbar, wenn man den prozentuale Anteil des Hirngewichtes vom Gesamtkörpergewicht errechnet hat.

Dabei zeigte sich der Anteil des Hirngewichts am Gesamtkörpergewicht von 1.6 % in der Kontrollgruppe. Die intrathekale Gruppe wies mit 1.52 % einen ähnlichen Wert auf. In der systemischen MP Gruppe zeigte sich mit 1.37 % jedoch ein signifikant niedrigerer Anteil. Eventuell ist der Unterschied im prozentualen Gewichtsanteil des Gehirns durch eine geringer Wassereinlagerung und Ödembildung bedingt.

Bei den normalen Tieren ohne CPB und KSTH lag der Anteil des Hirngewichtes bei 1.3 % bis 1.4 %, und war somit sehr ähnlich wie in der systemischen MP Gruppe.

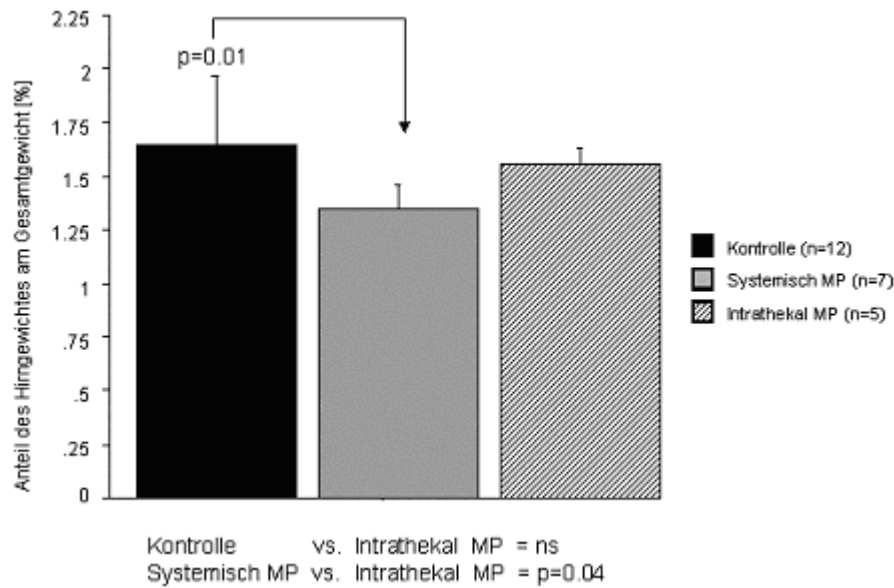


Abbildung 4-8: Postoperativer Anteil des Hirngewichtes am Gesamtkörpergewicht

Das Gehirngewicht betrug nach standardisierter Entnahme 31 bis 40 g (ohne Fixation).

Man kann daher folgern, dass es unter der systemischen Steroidapplikation postoperativ zu einer geringeren Gewichtszunahme kam.

4.3.3 Häodynamische Parameter

Die Auswertung der häodynamischen Parameter ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Abbildung IV-7 und IV-8). Sowohl die Kontrollgruppe, als auch die beiden Steroidgruppen zeigten vergleichbare häodynamische Werte ohne signifikante Unterschiede vor, während und nach KSTH.

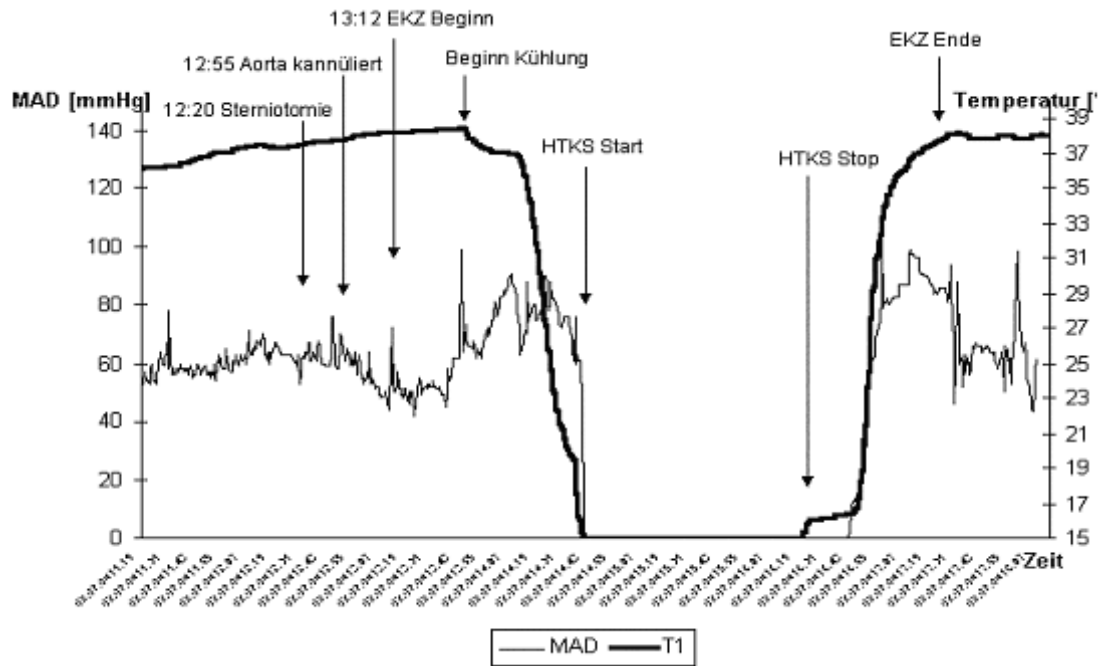


Abbildung 4-9: Originaldaten vom 10.07.2000

Langzeitverlauf des Blutdruckes und der Temperatur vor, während HLM und in der Reperfusion. Der postoperative Verlauf wurde nicht dargestellt. Markiert sind die wichtigsten Ereignisse und die Phase von 120 Minuten Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (KSTH). Die Werte des MAD in der Phase Reperfusion und postoperativ liegen circa 10-20 mmHg höher als das Ausgangsniveau. Deutlich zu erkennen ist der Druckabfall nach Abstellen des Bypasses und Beginn des KSTH.

Der Arterielle Mitteldruck (MAD) lag vor, während und nach dem CPB in einem Bereich von 60 bis 80 mmHg. Es zeigten sich ZVD-Werte zwischen 5 und 10 mmHg und auch die Herzfrequenz variiert in einem Bereich von 150 bis 220 Schläge pro Minute. In der Abbildung IV-9 ist deutlich zu erkennen die normotherme Phase des CPB mit anschließender Kühlung, und das Erreichen der 15°C Marke, mit anschließendem durch den Pumpenstop resultierendem Abfall des MAD auf Werte um Null mmHg. Nach 120 Minuten KSTH erfolgte dann die Wiedererwärmung, wobei entsprechend am Anfang der Reperfusion die Erwärmung mit einem langsam steigendem HLM-Fluß und einem maximalen Temperaturgradienten von 8°C zwischen dem Oxygenator und dem Blut begonnen wurde, der langsam bis zum Erreichen von circa 25 °C gesteigert wurde. Ab 25°C konnte dann mit normal hohem Maschinenfluss wiedererwärmt werden. Nach 50 Minuten war die Phase der Reperfusion abgeschlossen. Bei normaler Körpertemperatur folgte die langsame venöse Stauung mit gleichzeitiger Flussreduktion als sogenannter „Abgang von der HLM“ und das Ende des cardiopulmonalen Bypasses war erreicht.

Der Perfusionsdruck (MAD) und die Füllungsdrücke wie ZVD und PA lagen im physiologischen Bereich und zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen:

	Präoperativ	Cardiopulmonaler Bypass			Reperfusion	Postoperative Stunden			
HF (min ⁻¹)		37°C	15°C		37°C	1	2	4	6
Kontrolle	159 ± 26	162 ± 28	0	Hypothermer Kreislaufstillstand	208 ± 13	213 ± 11	197 ± 5	249 ± 23	260 ± 8
Systemisch MP	175 ± 16	205 ± 17	0		195 ± 18	210 ± 6	230 ± 15	223 ± 17	223 ± 2
Intrathekal MP	192 ± 35	227 ± 16	0		224 ± 4	229 ± 13	235 ± 17	211 ± 16	222 ± 13
MAD (mmHg)									
Kontrolle	62.7 ± 14.9	61.5 ± 8.2	62 ± 4.9		85.0 ± 7.0	74.0 ± 14.0	62.3 ± 2.4	66.4 ± 6.7	69.5 ± 2.5
Systemisch MP	78.4 ± 15.1	63.8 ± 8.6	64 ± 6.1		75.8 ± 8.0	72.8 ± 22.3	81.3 ± 8.3	68.2 ± 7.8	62.7 ± 6.9
Intrathekal MP	80.7 ± 2.2	76.3 ± 9.1	61 ± 5.3		78.5 ± 9.5	70.3 ± 11.4	83.5 ± 8.5	84.0 ± 4.0	76.7 ± 4.2
ZVD (mmHg)									
Kontrolle	5.4 ± 1.3	4.8 ± 1.4	6 ± 1.2		5.0 ± 0.4	9.0 ± 1.3	8.0 ± 1.3	6.5 ± 1.0	8.0 ± 1.4
Systemisch MP	3.8 ± 2.2	5.5 ± 2.2	5 ± 0.8		8.8 ± 1.4	9.0 ± 2.0	8.0 ± 2.5	8.5 ± 3.3	7.5 ± 2.5
Intrathekal MP	4.0 ± 2.0	4.0 ± 1.3	5 ± 1.1		4.3 ± 1.1	6.3 ± 2.4	9.0 ± 3.0	8.7 ± 3.6	8.0 ± 2.0

Abbildung 4-10: Hämodynamische Daten

Es zeigten sich in allen Gruppen während des gesamten Versuchs keine signifikanten Unterschiede für die hämodynamischen Parameter.

4.3.4 Veränderungen der Oxygenationswerte

Die Werte für das Hämoglobin verliefen in den Gruppen ebenfalls sehr ähnlich in einem Bereich von 8 g/dl bis 12 g/dl, das Hämatokrit-Werten von 25-40 % entsprach.

Die pH-Werte lagen in allen Gruppen vor KSTH im Normbereich bei $7,4 \pm 0,05$, nach KSTH in einem Bereich zwischen 7,21 und 7,5. Die niedrigsten Werte mit 7,21 bzw. 7,22 entstanden nach dem KSTH in der Reperfusionsphase. Diese pH-Werte erreichten weiteren Verlauf nach 1-2 Std. postoperativ wieder den Normbereich.

Die Partialdrücke für Sauerstoff (PO₂) unterschieden sich zwischen den einzelnen Gruppen und lagen in einem Bereich von 180 bis 326 mmHg. Durch die intensivierte Beatmung wurde der postoperativ erhöhte Sauerstoffbedarf gewährleistet und es gab in den durchgeführten Blutgasanalysen keinen Anhalt für ein vermindertes Angebot an Sauerstoff im arteriellen Blut. Die gemessenen Werte waren vergleichbar mit denen, die auch im klinischen Einsatz beobachtet werden. Die Werte für z.B. PO₂ etc. liegen insgesamt höher als der physiologische Bereich ohne eine derartige Operation.

	Präoperativ	Cardiopulmonaler Bypass			Reperfusion	Postoperative Stunden			
pH		37 °C	15 °C		37 °C	1	2	4	6
Kontrolle	7.46 ± 0.04	7.46 ± 0.04	7.42 ± 0.02	Hypothermer Kreislaufstillstand	7.23 ± 0.05	7.36 ± 0.03	7.37 ± 0.04	7.45 ± 0.03	7.40 ± 0.04
Systemisch MP	7.44 ± 0.06	7.40 ± 0.05	7.41 ± 0.05		7.21 ± 0.06	7.32 ± 0.06	7.34 ± 0.03	7.35 ± 0.02	7.35 ± 0.05
Intrathekal MP	7.38 ± 0.06	7.34 ± 0.05	7.38 ± 0.05		7.22 ± 0.04	7.39 ± 0.03	7.33 ± 0.04	7.32 ± 0.04	7.33 ± 0.03
Hämoglobin (mg/dl)									
Kontrolle	7.48 ± 0.89	9.24 ± 1.47	9.42 ± 1.47		8.98 ± 1.25	9.89 ± 1.2	9.46 ± 0.8	9.42 ± 1.3	9.26 ± 1.3
Systemisch MP	7.86 ± 0.63	9.91 ± 0.81	9.01 ± 0.51		8.38 ± 1.32	8.48 ± 1.1	8.92 ± 1.2	8.76 ± 1.7	8.82 ± 2.6
Intrathekal MP	7.45 ± 1.3	8.23 ± 1.36	8.98 ± 1.02		8.35 ± 0.9	9.01 ± 0.2	9.27 ± 0.5	9.9 ± 0.8	9.53 ± 1.3
PO ₂ (mmHg)									
Kontrolle	188 ± 5.6	225 ± 3.6	398 ± 8.6		214.95 ± 2.6	307 ± 2.3	264 ± 4.1	273 ± 3.5	314 ± 4.2
Systemisch MP	181 ± 6.4	228 ± 4.3	368 ± 9.3		181.8 ± 2.3	217 ± 2.1	252 ± 2.3	221 ± 2.6	298 ± 5.6
Intrathekal MP	205 ± 12.4	192 ± 4.6	384 ± 9.6		208.25 ± 3.1	208 ± 1.8	246 ± 3.1	224 ± 3.1	274 ± 6.5
PCO ₂ (mmHg)									
Kontrolle	31 ± 1.5	38 ± 2.3	39 ± 2.3		35 ± 1.9	28 ± 0.8	33 ± 1.2	24 ± 0.9	33 ± 2.1
Systemisch MP	32 ± 2.1	38 ± 2.6	37 ± 1.9		37 ± 1.2	28 ± 0.6	30 ± 0.9	30 ± 1.2	35 ± 2.1
Intrathekal MP	33 ± 1.9	37 ± 2.4	38 ± 1.4		36 ± 2.1	30 ± 1.2	33 ± 1.2	33 ± 1.1	31 ± 3.1

Abbildung 4-11: Arterielle Blutgase

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für pH-Wert, Sättigung, PO₂ und PCO₂ in der arteriellen Blutgasanalyse.

Die Partialdrücke für Kohlendioxid (PCO₂) lagen insgesamt im unteren Normbereich und variierten unter den Gruppen in einem Bereich zwischen 28 und 45 mmHg. Eine Hyperventilation war postoperativ bei allen Tieren notwendig, um bei erhöhtem pulmonalen Widerstand und einer nach zwei Stunden Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie beeinträchtigten Lungenmechanik eine ausreichende Belüftung und Oxygenation zu gewährleisten.

4.3.5 Veränderungen des Calciumstoffwechsels

Die präoperativen Werte waren in allen Gruppen mit ca. 0,8 mmol/l gleich. Nach KSTH lagen die Calcium-Werte nur in der intrathekalen Steroidgruppe mit 0,48 mmol/l gegenüber 0,85 mmol/l in den beiden anderen Gruppen deutlich niedriger. Postoperativ stiegen die Werte in allen Gruppen unterschiedlich an, wobei in der systemischen MP Gruppe die deutlichste Zunahme beobachtet werden konnte. In der postoperativen Phase wurde durch die systemische MP Gruppe eine Maximum von ca. 1,3 mmol/l nach 2-4 Std. erreicht. Die Calciumwerte in der intrathekale MP Gruppe blieben postoperativ jederzeit signifikant niedriger als in den beiden anderen Gruppen. Im späten postoperativen Verlauf kam es dann wieder zu einer langsamen Angleichung aller Gruppen auf Werte im Bereich von 0,8 und 1,2 mmol/l, jedoch blieben die Werte in der systemischen MP Gruppe auch nach 6 Std. weiterhin erhöht.

Der Calciumstoffwechsel ist für eine Ischämie-Reperfusion von Bedeutung. Betrachtet man die Calciumwerte, so ergaben sich bei gleichen präoperativen Werten deutliche Unterschiede in der postoperativen Phase nach KSTH, wobei die intrathekal behandelten Tiere im arteriellen und zerebralvenösen Blut signifikant niedrigere Werte ($p=0.02$) aufwiesen, als die Kontroll- und systemisch behandelte Steroidgruppe.

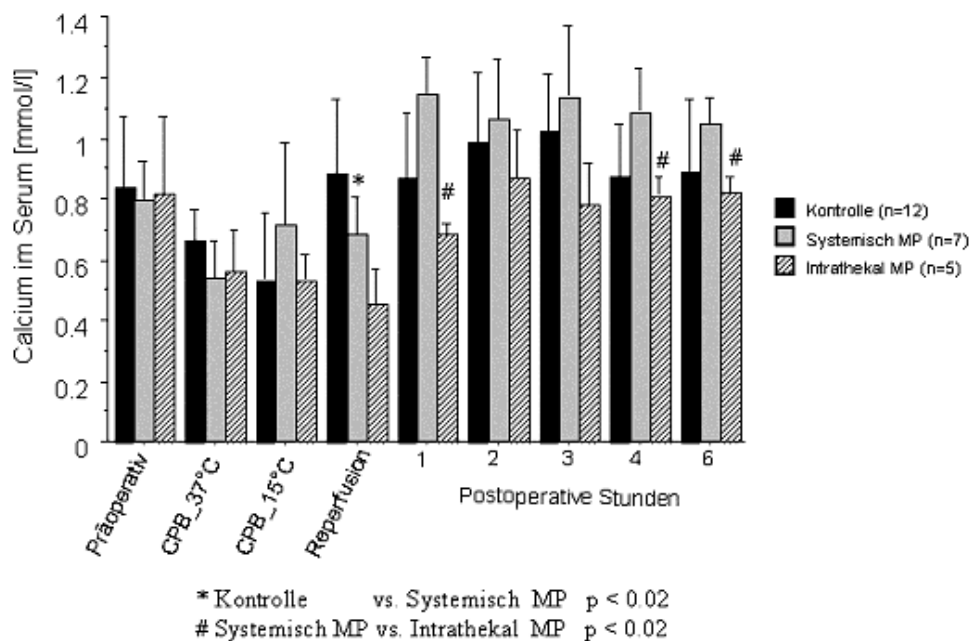


Abbildung 4-12: Calciumwerte im Serum

Präoperativ zeigten sich gleiche Werte für Calcium im Serum. Nach KSTH traten dann nur in der intrathekalen Gruppe signifikant niedrigere Werte auf ($p < 0.02$). Die systemische Gruppe wies die höchsten Calciumwerte auf, eine Normalisierung blieb aus.*

4.3.6 Veränderungen des Natrium- und Kaliumstoffwechsels

Präoperativ lagen die Werte für Natrium, Kalium und Calcium im Normbereich. Auch im weiteren Verlauf der Untersuchung zeigten die Werte keinen signifikanten Unterschied. Die Kaliumwerte zeigten einen Unterschied, so waren in der intrathekalen Steroidgruppe nach KSTH Kalium mit 3.95 mmol/l niedriger, verglichen mit >5 mmol/l in den beiden anderen Gruppen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

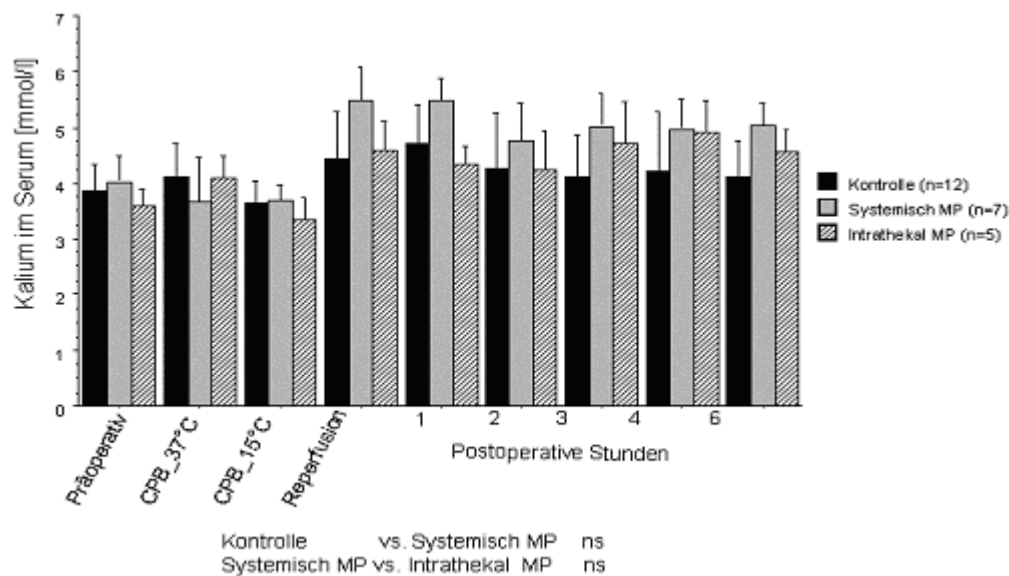


Abbildung 4-13: Kaliumwerte im Serum

Der Unterschied für Kalium im Serum war vor KSTH nicht signifikant, nach KSTH zeigten sich etwas höhere Werte in der systemischen Steroidgruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Die Werte nach KSTH waren in der intrathekalen Gruppe am niedrigsten.

4.3.7 Hyperglykämie

Die Messung der Blutzuckerwerte ergaben signifikante Abweichungen zwischen den Gruppen. Nach Beginn des cardiopulmonalen Bypasses kam es zu einem Anstieg der Blutzucker-Werte in allen Gruppen von circa 100 mg/dl auf Werte um ca. 200 mg/dl. Dieser Anstieg war wahrscheinlich durch das Maschinen-Priming und die Blutkonserven bedingt.

Nach 120 Minuten KSTH zeigte sich dann aber in beiden Steroidgruppen gegenüber den präoperativen Werten eine deutlich Erhöhung der Blutzuckerwerte, wobei unter systemischen MP Gabe signifikant höhere Werte erreicht wurden als durch intrathekale MP Applikation. Die Kontrollgruppe zeigte nur geringe Änderungen der BZ-Werte. Während sich in der intrathekalen Gruppe die Glucosewerte im weiteren

postoperativen wieder auf hoch normale Werte um 200 mg/dl anglichen, persistierten die signifikant höheren BZ-Werte in der systemischen MP-Gruppe bei Werten um 300-350 mg/dl ($p=0.001$).

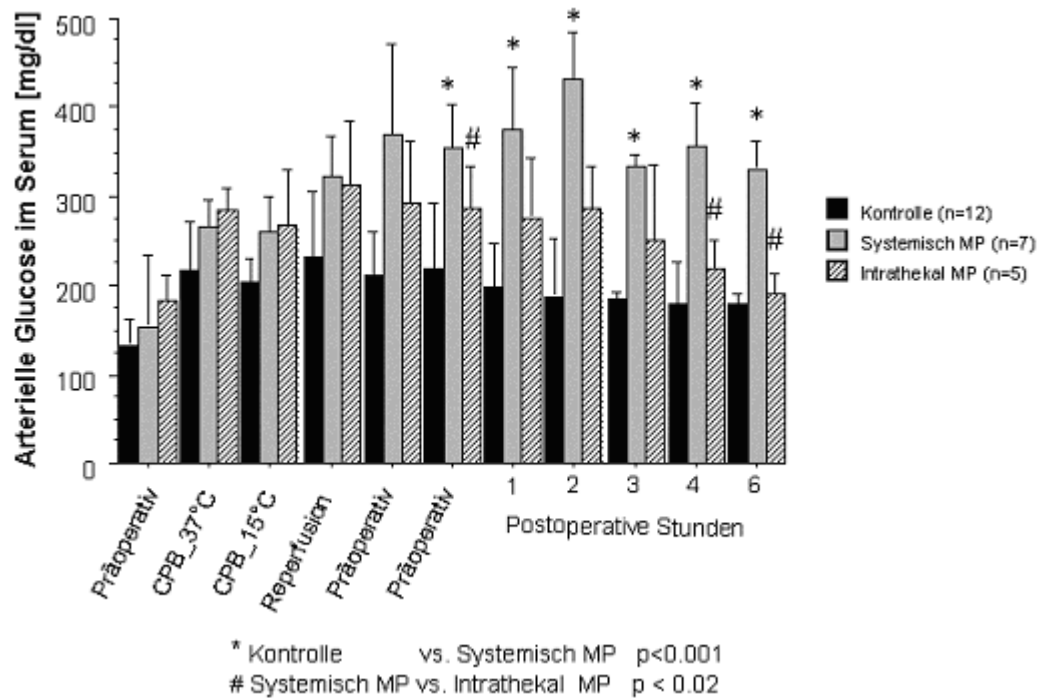


Abbildung 4-14: Glucose im arteriellen Blut

Es zeigt sich eine signifikante persistierende Hyperglykämie in der systemisch Steroidgruppe (Systemische MP), im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($p=0.001$). Die intrathekale MP Gruppe zeigte nur eine temporäre Erhöhung der BZ-Werte, welche sich im Verlauf wieder an die Kontrollgruppe anglich.

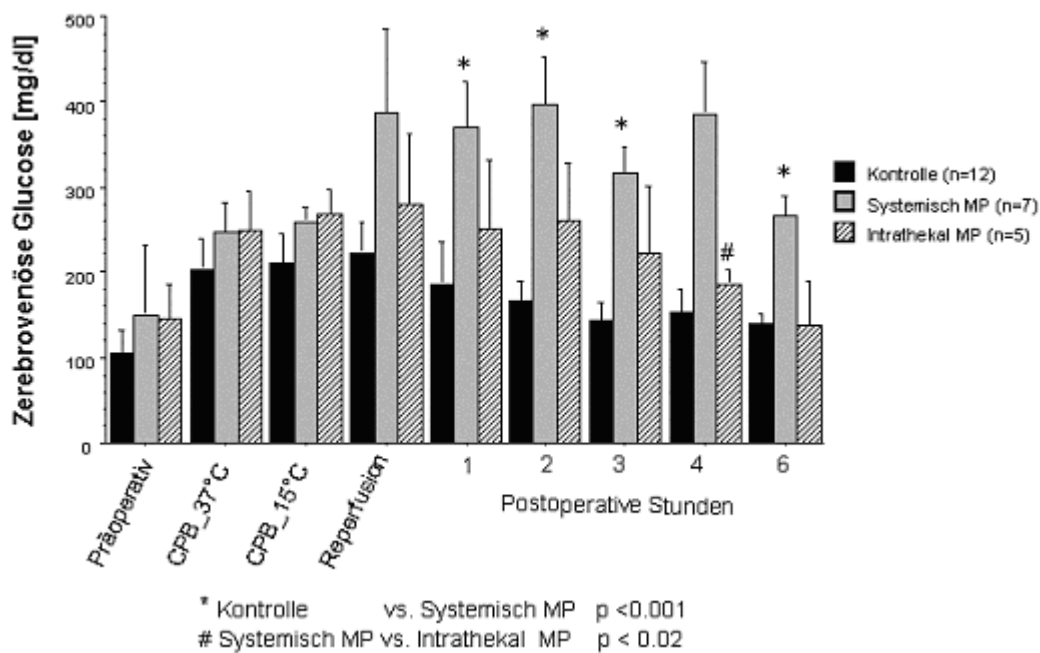


Abbildung 4-15: Glucose im zerebrovenösen Blut (V. jugularis)

Übersicht der Werte aus dem zerebralen und venösen Rückstrom in der Vena jugularis. Zu erkennen ist eine signifikante Hyperglykämie in der Systemischen MP Gruppe ($p=0.001$).

Die entstandene Hyperglykämie scheint im Rahmen einer Steroidgabe abhängig von der Applikationsart zu sein, und nach KSTH nur bei einer systemischen Verabreichung des Methylprednisolons signifikant höhere Werte aufzuweisen.

4.3.8 Neuronale Nekrose im Hippocampus nach Steroidbehandlung

Der Einfluss der systemischen Applikation des Methylprednisolons (Systemisch MP) führte nicht zu dem erwünschten neuroprotektiven Effekt. Durch die systemische MP-Gabe zeigte sich keinerlei Verbesserungen des neuronalen Schädigungsmusters. Im Gegenteil kam es zu einer Zunahme der neuronalen Nekrose im Hippocampus im CA 4 auf einen prozentualen Wert von $85,4 \pm 8,48 \%$. Die Kontrolltiere wiesen ca. 77 % Nekrose auf. Im CA 1 kam es unter der systemischen Steroidgabe auch zu einer Zunahme der nekrotischen Neurone von ca. 40 % (Kontrollgruppe) auf 65 %.

Obwohl in der morphologischen Untersuchung das perivaskuläre Ödem subjektiv etwas milder ausfiel, kam es doch zu einem deutlichen perineuralem Ödem bei den betroffenen nekrotischen Zellen.

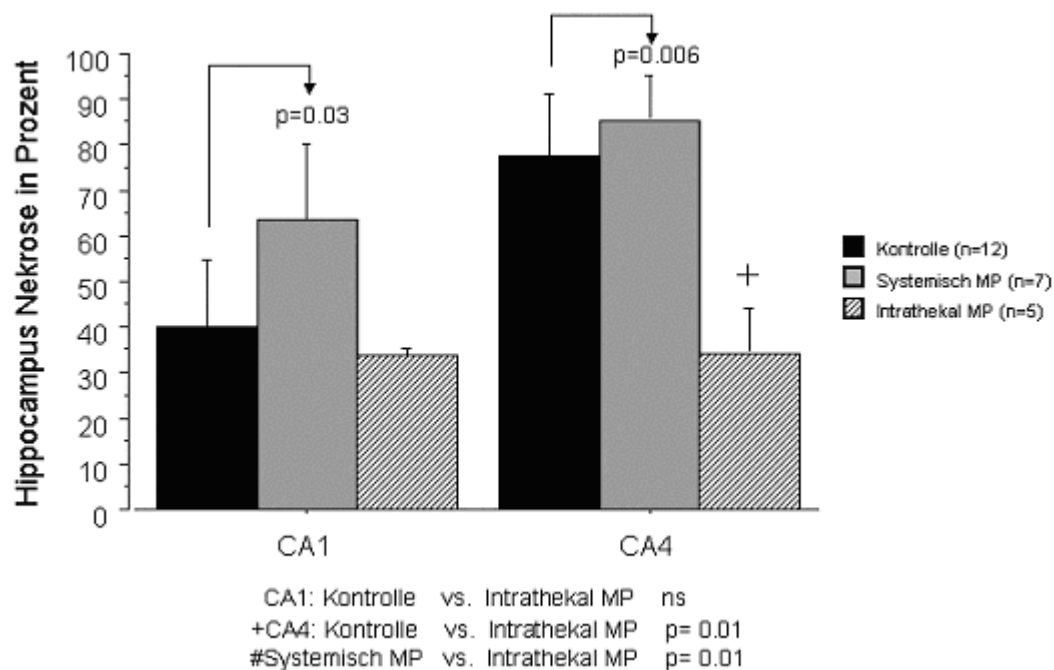


Abbildung 4-16: Nekrose im Hippocampus

Die Systemische MP Gabe führte zu einer signifikanten Zunahme der Zellschädigung im Sektor CA 1 und CA 4 ($p=0.03$ bzw. $p=0.006$) und somit zu einer Verschlechterung des Schädigungsmusters nach KSTH. Bei der intrathekalen MP Gruppe zeigte sich dafür im Bereich CA 1 und CA 4 eine signifikante Abnahme der nekrotischen Neurone gegenüber der systemischen MP Behandlung ($p=0.01$). Gegenüber den Kontrolltieren zeigte sich aber nur im CA 4 eine Reduktion der Zellschädigung ($p=0.01$). Die Auswertung erfolgte am Hämatoxylin-Eosin-Schnitt und gezählt wurden 500 ± 60 Neurone.

Die intrathekale Behandlung mit Methylprednisolon (Intrathekal MP) zeigte einen unterschiedlichen Effekt im Gehirn. Nach der intrathekale Vorbehandlung der Tiere konnte eine signifikante Reduktion der nekrotischen Veränderungen im CA 4 des Hippocampus erreicht werden ($p=0.01$). Im CA 1 zeigten sich gegenüber der Kontrollgruppe nur eine geringe und nicht signifikante Reduktion.

Somit konnte durch eine Behandlung mit intrathekalen und nicht mit systemischen Steroiden eine signifikante Verbesserung des Schädigungsmusters im Hippocampus erreicht werden. Der Fokus der Schädigung lag bei der Kontrollgruppe und der systemischen MP-Gruppe in den Sektoren CA 4 des Hippocampus.

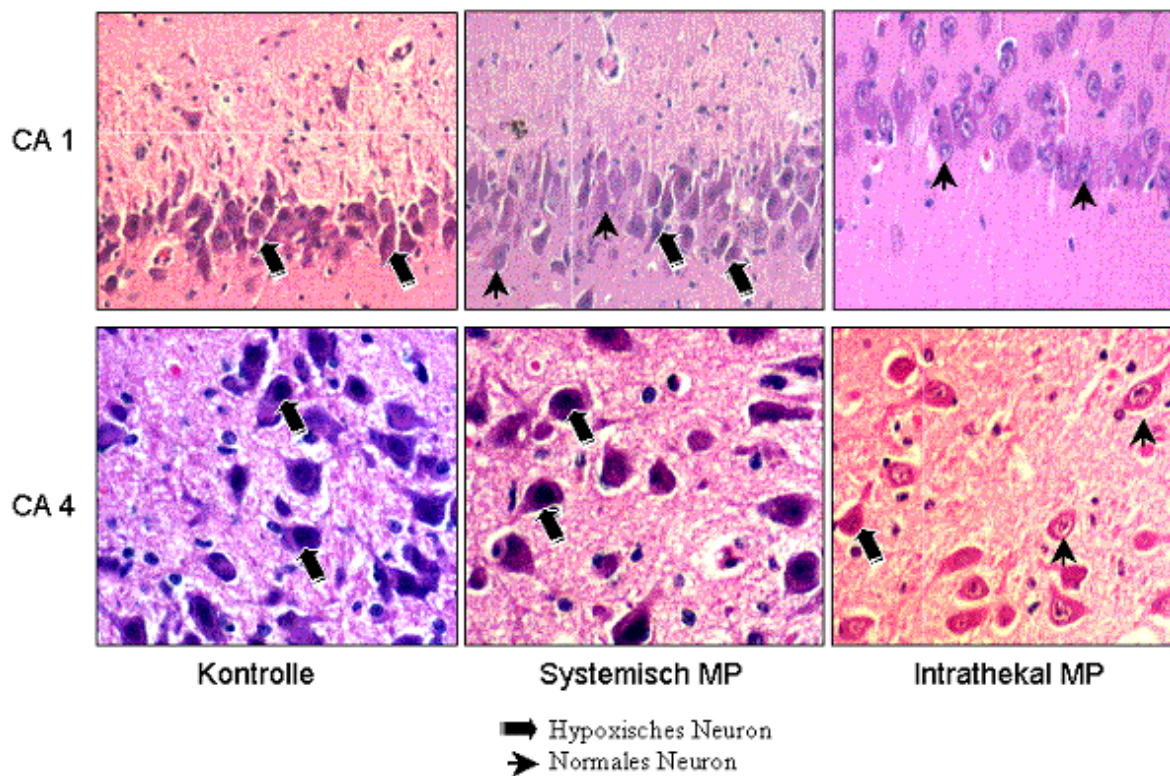


Abbildung 4-17: Nekrose im CA 1 und CA 4 des Hippocampus

Gegenübergestellt sind alle drei Gruppen mit repräsentativen histologischen Schnitten. Die Hypoxischen Neuronen sind mit einem Blockpfeil, die normalen mit dünnen Pfeil markiert. In der intrathekalen Gruppe zeigten sich signifikant weniger hypoxische Neurone.

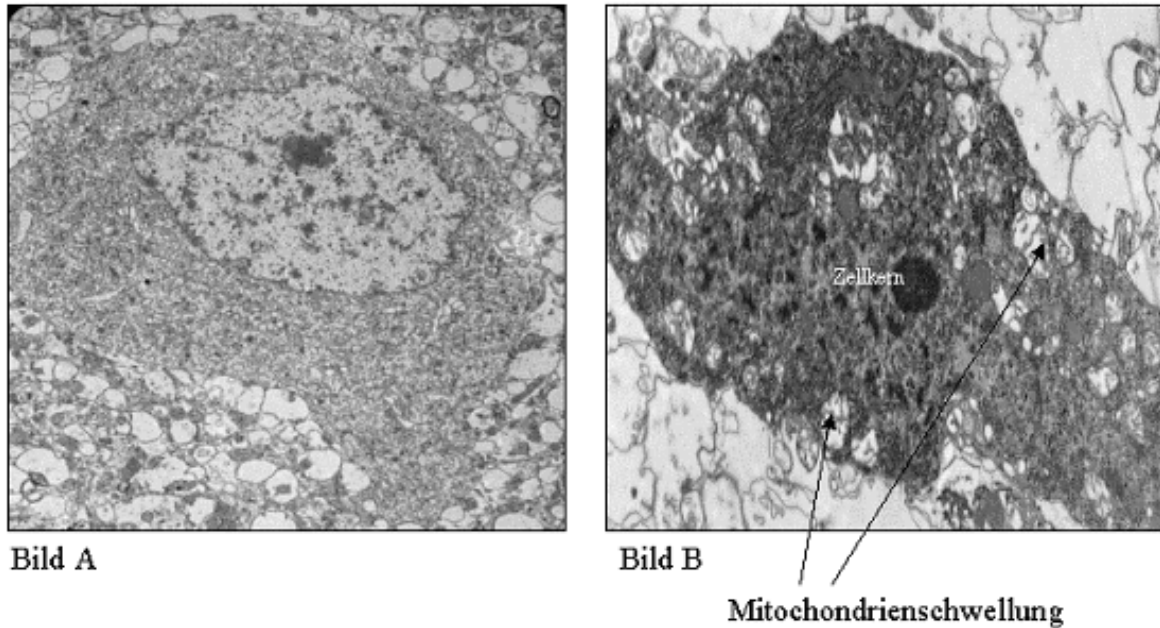


Abbildung 4-18: Nekrose in der Elektronenmikroskopie

In Bild A ist ein normales Neuron dargestellt. Bild B zeigt ein nekrotisches Neuron mit Kernpyknose und Zellschrumpfung, sowie deutlich geschwollenen Mitochondrien. Das Neuron ist von einem deutlichen Ödem umgeben.

4.3.9 Neuronale Apoptose im Hippocampus nach Steroidbehandlung

Der Einfluss der Steroide führte neben dem oben genannten Einfluss auf die Nervenzellnekrose zusätzlich zu einer Zunahme apoptotischer Zellenveränderungen im Hippocampus. Die apoptotischen Neurone unterschieden sich von den nekrotischen N. deutlich durch ihre typischen Kernveränderungen und die Kondensation des Chromatin's bei intaktem Zytoplasma. Zusätzlich zeigten diese Zellen eine verstärkte Eosinophilie. Der Fokus der apoptotischen Nervenzellveränderungen lag im Gyrus dentatus der Hippocampus-Formation. Der Anteil apoptotischer Zellveränderungen war dort in der Kontrollgruppe ohne den Einfluss einer Steroidbehandlung mit $8.6 \pm 3.4 \%$ aller Zellen relativ niedrig.

Unter dem Einfluss der systemischen Steroidintervention kam es zu einer signifikanten Zunahme der apoptotischen Veränderungen. Wobei der Anteil apoptotischer Neurone an der Gesamtzahl der Neurone im Gyrus dentatus nach systemischer Gabe von Methylprednisolon auf $28 \pm 7 \%$ und nach intrathekalen Gabe auf $20 \pm 3 \%$ zunahm. Das Auftreten apoptotischer Zellveränderungen stellte somit eine sehr wichtige „Nebenwirkung“ der Steroidtherapie dar und wurde einer differenzierten Analyse unterzogen.

Die Apoptose wurde anhand einer spezifischen TUNEL-Färbung und im Semidünnschnitt morphologisch, die Abbildungen 4-17 und 4-18 zeigen die Ergebnisse der selektiven Anfärbung im Gyrus dentatus.

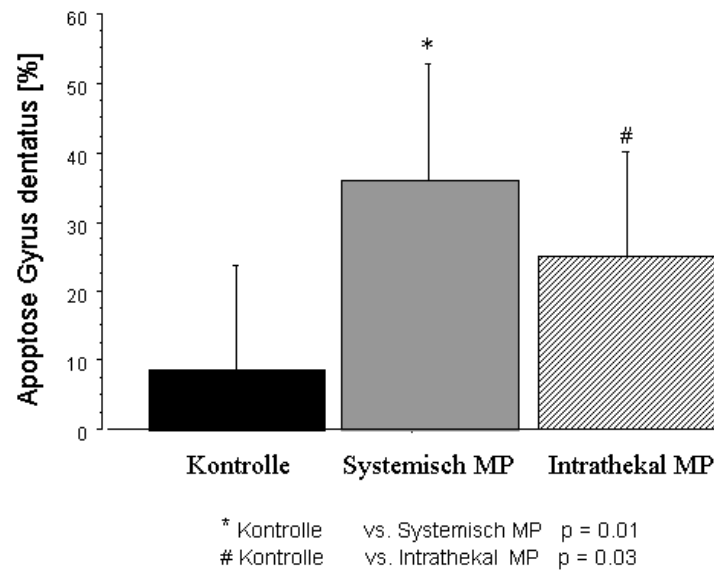


Abbildung 4-19: Apoptose im Gyrus dentatus (GD) nach Steroidbehandlung

Deutlich zu erkennen ist der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Steroidgruppen. Wobei die systemisch behandelten Tiere mit 36 % einen signifikant höheren Anteil apoptotischer Veränderungen zeigten als die intrathekalen 25 %, die systemische Steroidgruppe unterschied sich aber signifikant ($p=0.01$) von der Kontrollgruppe. Das Zunahme der Apoptose nach intrathekaler Intervention gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls mit ($p=0.03$) signifikant.

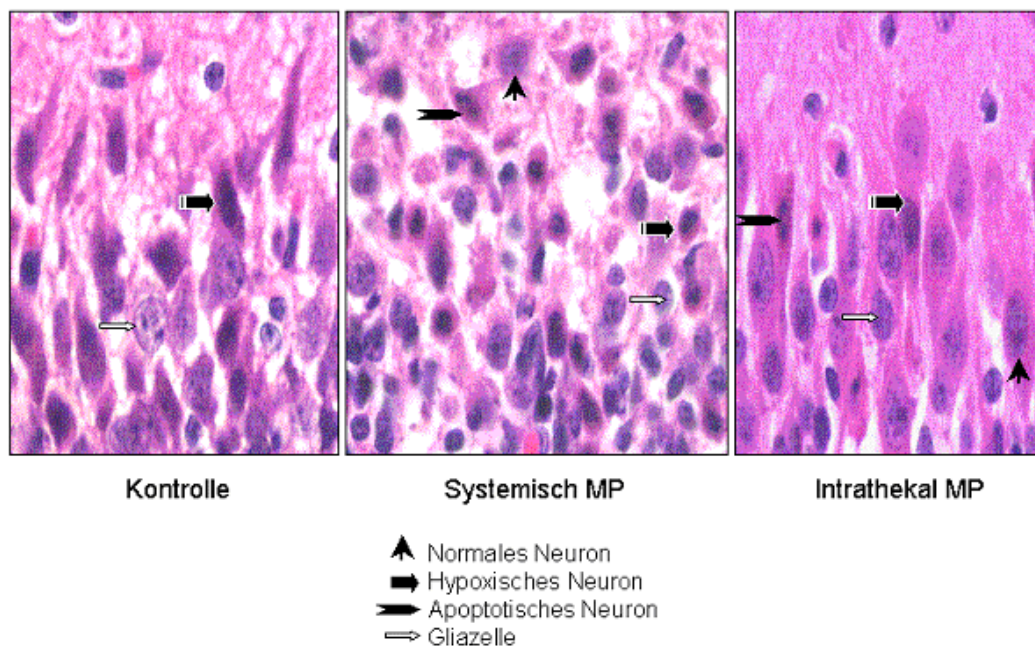


Abbildung 4-20: Apoptotische Veränderungen im Gyrus dentatus

Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen. Hierbei zeigte sich, dass in den Steroid behandelten Tieren die Anzahl apoptotischer Neurone deutlich höher ist, als bei den Kontrolltieren.

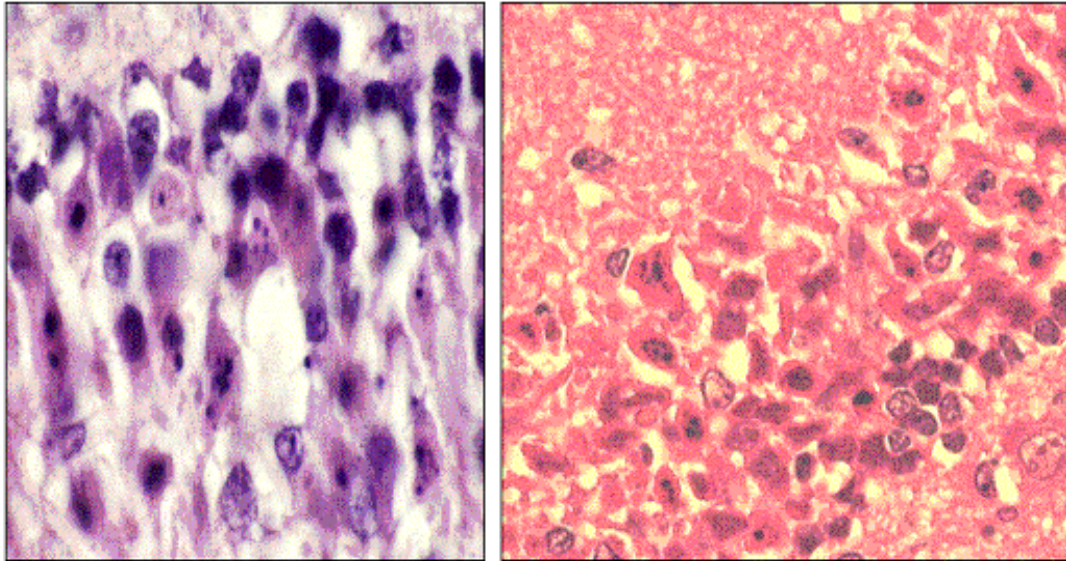


Abbildung 4-21: Apoptotische Veränderungen im Gyrus dentatus

Die Hirnschnitte stammen von einem Versuchstier mit systemischer Methylprednisolon-Behandlung. In den beiden Abbildungen erkennt man apoptotische Neurone in einem Ausschnitt des Gyrus dentatus mit kaum geschrumpften Neuronen sowie mit gekörntem Zellkern und einem hellroten eosinophilen Zytoplasma.

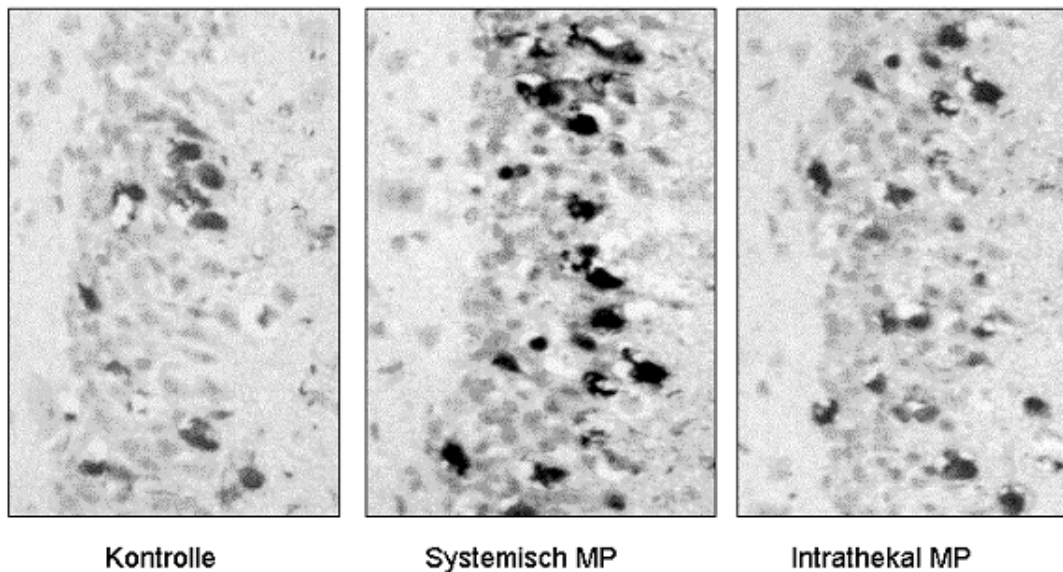


Abbildung 4-22: Apoptose des Gyrus dentatus in TUNEL-Färbung

Selektiv werden hier die apoptotischen Neurone im Gyrus dentatus dargestellt (dunkel markierte Zellen). Von links nach rechts sind die Kontrolltiere, die systemischen MP und die intrathekalen MP Tiere dargestellt. Der Einfluss des systemischen MP zeigt eine vermehrte Anfärbbarkeit apoptotischer Neurone im GD (mittleres Bild). Nach intrathekalen MP Behandlung zeigten sich ebenfalls mehr Apoptosen als in der Kontrollgruppe, aber deutlich weniger TUNEL positive Zellen als bei den systemischen Steroiden.

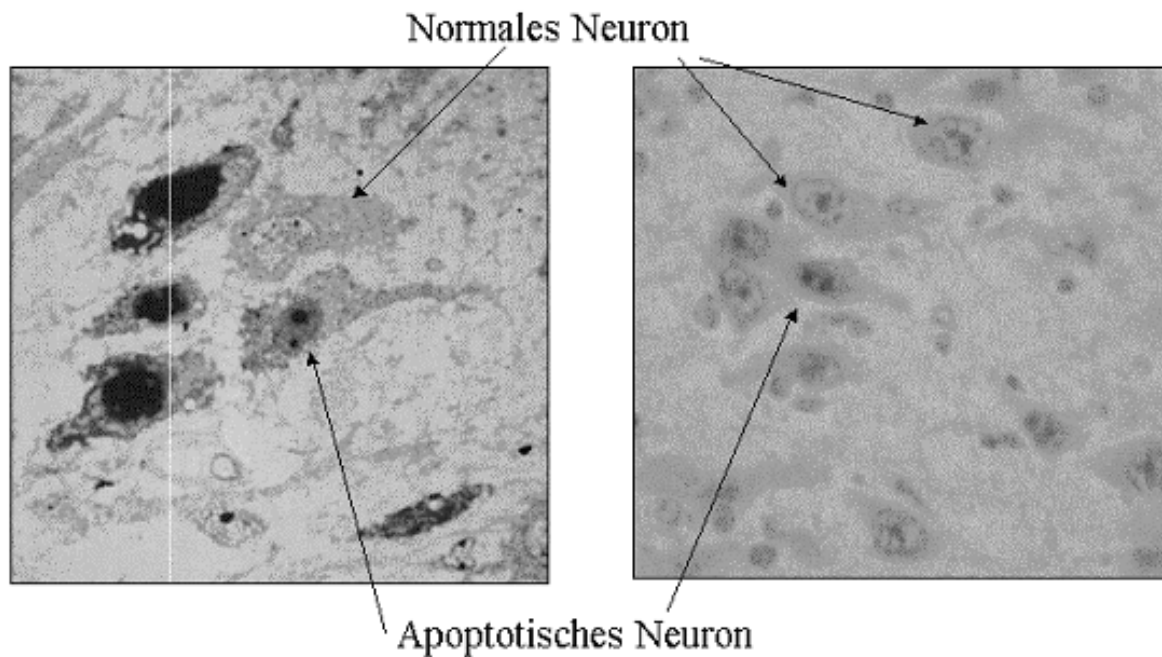


Abbildung 4-23: Apoptose in Semidünnschnitten

Man sieht normale Neurone mit sichtbar erhaltenem Zellkern und normalem Zytoplasma. In der Umgebung sieht man Neuronen mit dunklem geschrumpften und zu kleinen Blasen kondensiertem Zellkern bei noch erhaltenem Zytoplasma, welche die Veränderungen im Sinne der Apoptose mit Chromatinkondensation und Kernfragmentation aufzeigen.

Die Zunahme apoptotischer Nervenzellveränderungen im Hippocampus kann sicher nicht im Sinne einer neuroprotektiven Strategie gewertet werden. Die Form der Steroidapplikation scheint aber einen entscheidenden Einfluss auf das Schädigungsmuster nach KSTH von 120 Minuten im Hippocampus zu haben.

4.3.10 Neuronale Nekrose im Gyrus cinguli (parietaler Cortex)

Stellvertretend für den parietalen Neocortex wurden die Neurone des Windungstals im Gyrus cinguli für normale, nekrotische und apoptotische Zellveränderungen quantifiziert.

Die morphologische Einteilung des GC beruht auf einer Schichtung der Neurone nach Größe und Funktion. Dabei beginnt außen die Schicht I und nach innen folgen fortlaufend die Schichten II bis V. In der Schicht II und V sind die Neurone am größten und es zeigte sich, dass in diesen Schichten mehr nekrotische Neurone vorlagen. Dabei könnte ein Zusammenhang zwischen Neuronengröße und der Empfindlichkeit gegenüber einer Hypoxie bestehen.

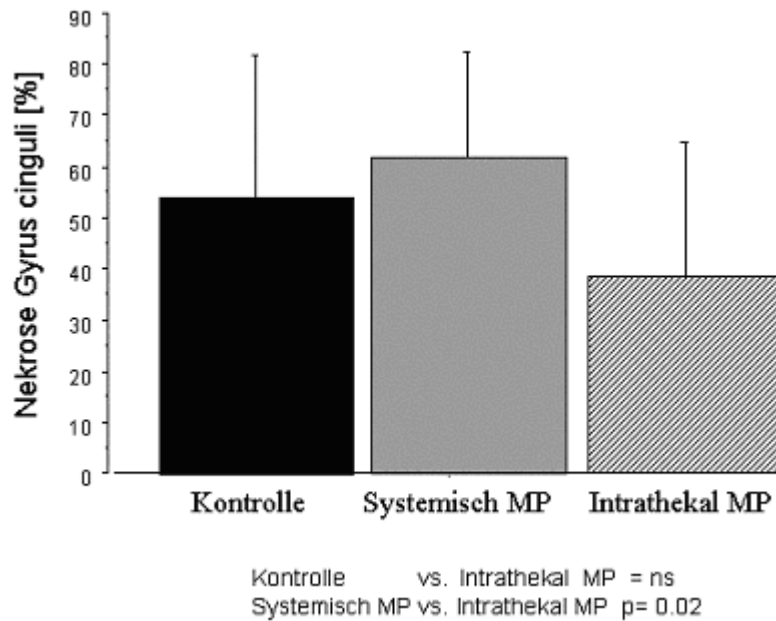


Abbildung 4-24: Nekrose im Gyrus cinguli (Neocortex)

Bei relativ ähnlich hohem Anteil nekrotischer Veränderungen in Kontroll- und systemischer Steroidgruppe, zeigte sich ein deutliche besseres Abschneiden der intrathekalen Steroidgruppe. Dabei waren die errechneten Unterschiede zwischen beiden Steroidgruppen signifikant ($p=0.026$), jedoch nicht signifikant war der Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Das Ausmaß der Schädigung lag bei der Kontrollgruppe mit einem errechneten Mittelwert von mit 65 ± 25 % aller gezählten Neurone relativ hoch. In der systemischen Steroidgruppe bot sich ein ähnliches Ausmaß der Schädigung mit einem Mittelwert von 61 ± 15 % neuronaler Nekrose. Die Intervention mit systemischen Steroiden zeigte somit keine Verbesserung der nekrotischen Schädigung im Neocortex. Im Gegensatz dazu lag in der intrathekalen Steroidgruppe der Mittelwert bei 30 ± 7 % und der Anteil nekrotischer Veränderungen fiel somit signifikant niedriger aus, als in den beiden anderen Gruppen ($p=0.026$).

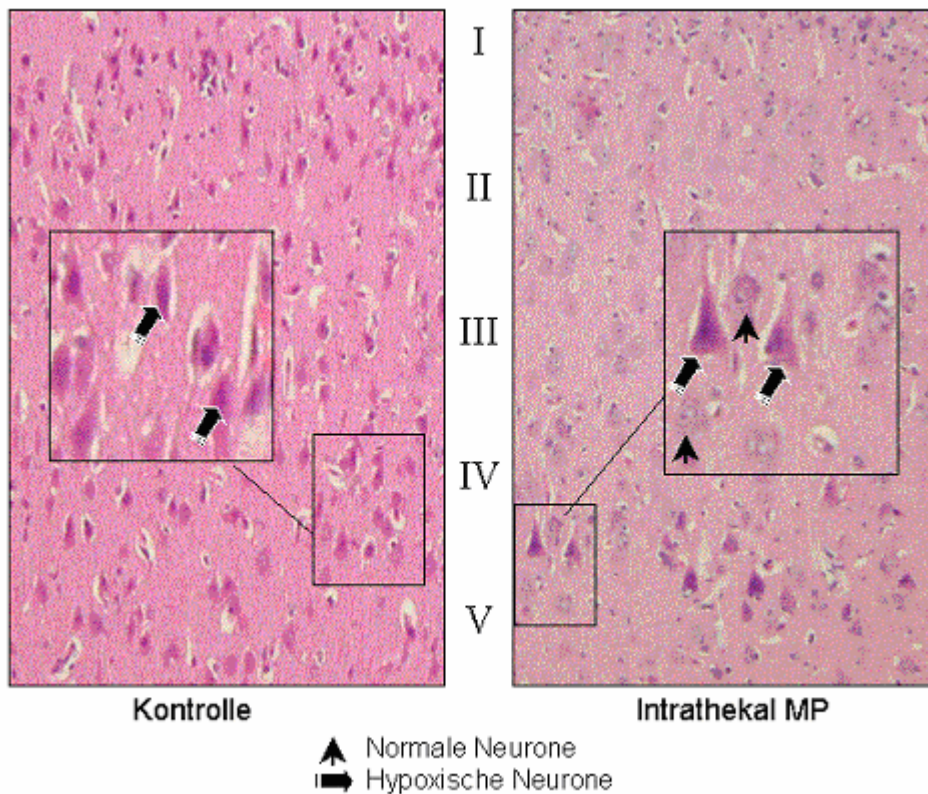


Abbildung 4-25: Nekrose im Gyrus cinguli (Neocortex)

Dargestellt sind HE-Schnitte aus dem Gyrus cinguli (GC), mit einer Schichtung der einzelnen Neurone unterschiedlicher Größe (Römische Ziffern I-V). Im linken Schnitt ist der GC eines Kontrolltieres gezeigt bei dem fast alle Neurone nekrotisch verändert sind. Rechts dargestellt ist der Gyrus cinguli eines Tieres der intrathekalen Gruppe. Hier zeigt sich ein sehr geringer Anteil neuronaler Nekrose. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen hypoxische (breiter Pfeil) und normale (dünner Pfeil) Neurone.

Im Neocortex konnte ein protektiver Einfluss der Steroide bei intrathekalen Gabe und nicht bei systemischer Gabe erzielt werden. Die Kontrollgruppe und die systemisch behandelte MP Gruppe zeigten einen sehr ähnlichen Anteil nekrotischer Veränderungen im Gyrus cinguli, einzig durch die intrathekale Behandlung mit MP konnte ein signifikant neuroprotektiver Effekt erzielt werden.

4.3.11 Neuronale Apoptose im Gyrus cinguli

Vereinzelt traten nach der Steroidbehandlung auch apoptotische Veränderungen im Gyrus cinguli auf, der Anteil lag bei ca. 10 % der Neuronen. Vor allem die kleineren Neurone waren apoptotisch verändert, aber es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Steroidgruppen beobachtet werden. Eine Quantifizierung wurde nicht durchgeführt. Zusätzlich konnte im Windungstal des Gyrus einige Apoptosen der Oligodrogliazellen beobachtet werden. Da es sich um einzelne Befunde handelte, wurde auf eine ausführliche Darstellung hier verzichtet.

4.3.12 Neuronale Nekrose im Nucleus caudatus

In den Stammganglien zeigte sich eher eine lokalisierte Schädigung in einigen Kerngebieten. Die Schädigung im Nucleus caudatus war nicht so ausgeprägt und mit 30-40 % in allen Versuchsgruppen sehr ähnlich war. Hierin bestand eine Abweichung von anderen Studien, in denen der Anteil der Schädigung im Ncl. Caudatus wesentlich höher lag ⁹⁸. Bei allen Tieren waren deutlich stärker die dem Hirnventrikelsystem zugewandten Bereich betroffen. Es zeichnete sich hier eine lokalisierte Schädigung in Nähe des Liquor cerebrospinalis ab, welche in einem Zusammenhang mit metabolischen oder perfusionsbedingten Veränderungen des Liquorraumes stehen könnte. Da zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied bestand, wurden die Veränderungen in diesem Bereich nicht so ausführlich diskutiert.

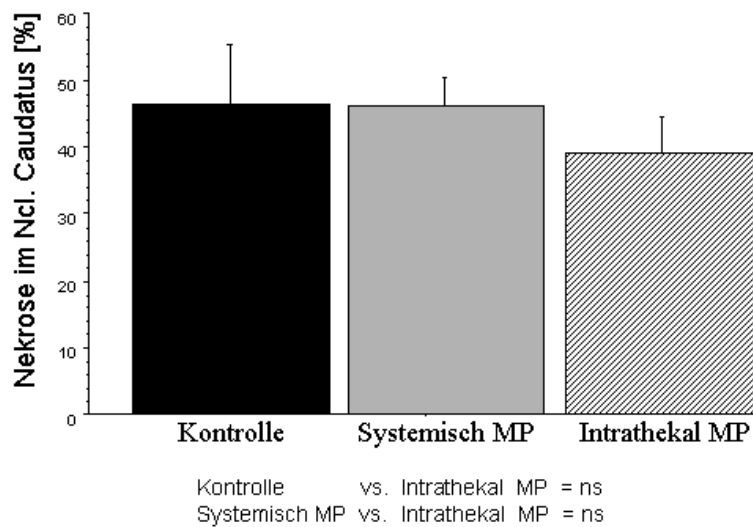


Abbildung 4-26: Nekrose im Nucleus caudatus

Bei insgesamt moderater Schädigung gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen im Ncl. caudatus. Das Ausmaß nekrotischer Veränderungen lag im Bereich zwischen 40 und 50 % in allen Gruppen. Morphometrische Zählmethode am HE-Schnitt (320 ± 45 Neurone).

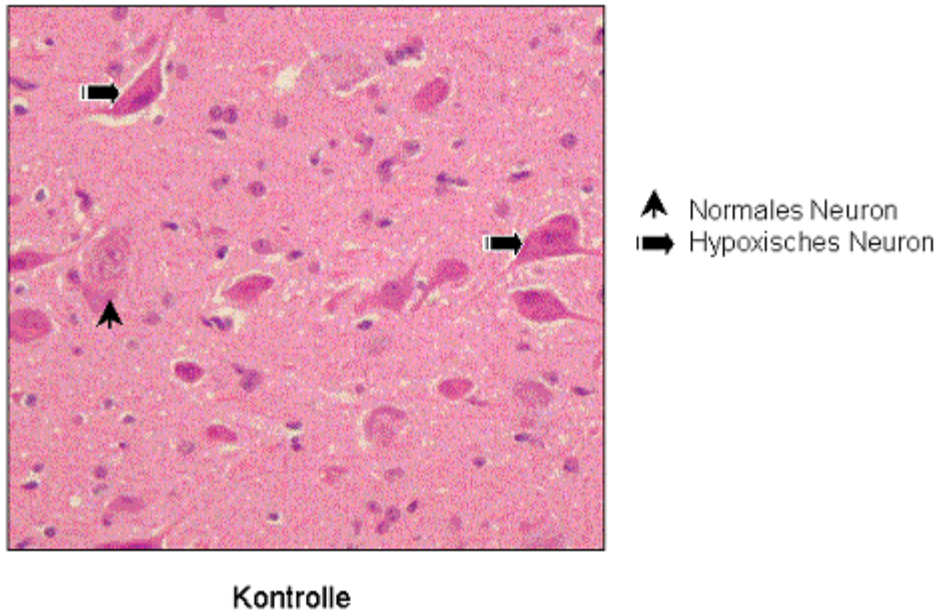


Abbildung 4-27: Nekrotische Veränderungen im Nucleus caudatus

Hier sieht man normale (dünner Pfeil) und hypoxisch-nekrotische Neurone (Blockpfeil). Der Nucleus caudatus war in allen Gruppen nur mit 40-50 % durch Nekrose betroffen. Es gab keine signifikanten Unterschiede.

4.3.13 Neuronale Nekrose im Kleinhirn

Bei der Analyse des Kleinhirns wurden vor allem die Veränderungen der größten Zellen des Kleinhirns, nämlich die oberhalb der Körnerzellschicht liegenden Purkinje-Zellen, beurteilt. Dabei wurden mittels Gitterplatte jeweils 150 ± 15 Zellen gezählt und auf nekrotische oder apoptotische Zellveränderungen hin beurteilt. Zellen mit Eosinophilie, Kernpyknose oder genereller Zellschrumpfung wurden als nekrotisch gewertet. Es zeigte sich ein sehr hoher Anteil nekrotischer Neurone mit $70 \pm 17\%$ bei den Kontrolltieren und mit $79 \pm 9\%$ ein etwas höherer Anteil in der Gruppe des systemischen MP. Die Purkinje-Zellen waren in beiden Gruppen durch Kernpyknose, Eosinophilie und Zellschrumpfung verändert. Die Nekrose der Purkinje-Zellen war in der intrathekalen Steroidgruppe mit einem mittleren Wert von $43 \pm 12\%$ signifikant geringer als in den anderen beiden Gruppen. Durch die intrathekale Intervention konnte somit ein neuroprotektiver Einfluss auf die Nekroseentstehung der Purkinje-Zellen im Kleinhirn erreicht werden.

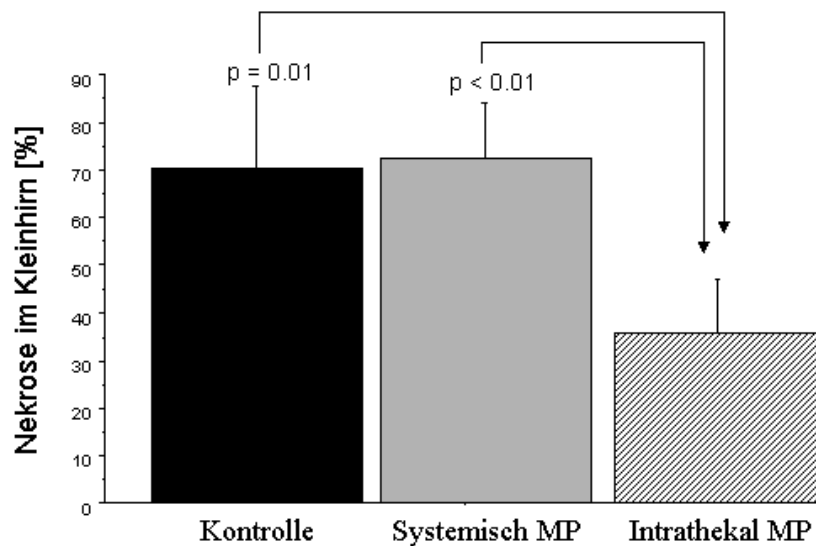


Abbildung 4-28: Nekrose der Purkinje-Zellen im Kleinhirn

Insgesamt zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen bei der Betrachtung der Purkinje-Zellen im Kleinhirn. Die prozentuale Angabe erfolgte als Anteil nekrotischer Zellen an der Gesamtzahl (150 ± 15) der gezählten Neurone.

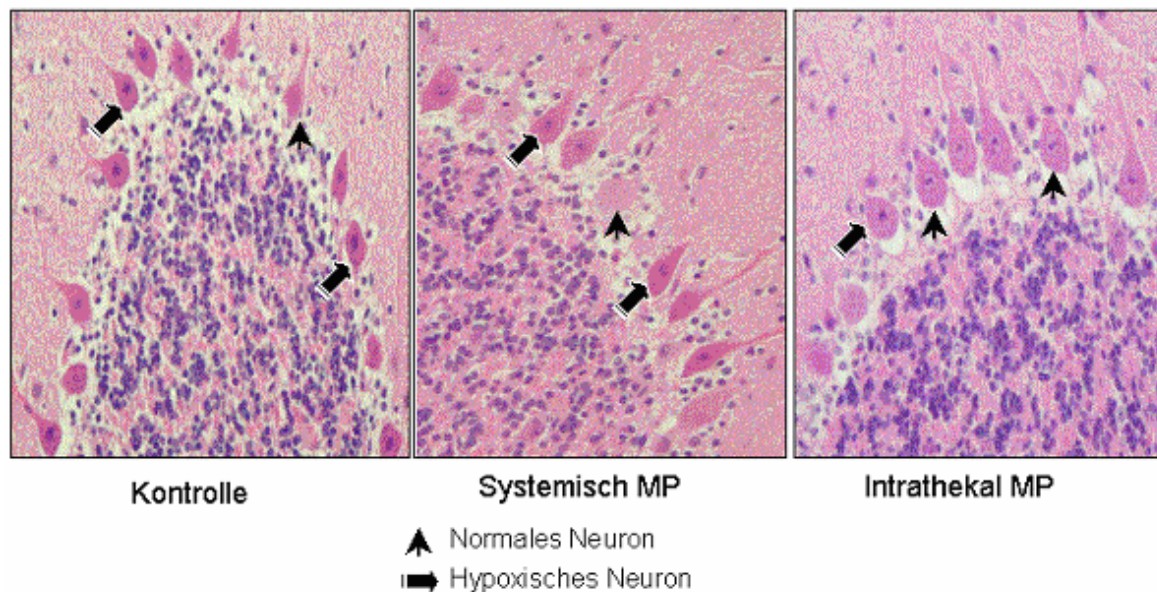


Abbildung 4-29: Nekrose der Purkinje-Zellen im Kleinhirn

Repräsentativer Schnitt aus dem Kleinhirn mit Darstellung der Purkinje-Zellen ringförmig oberhalb der Körnerschicht. Teilweise sind die großen Axone und Dendriten sichtbar und ebenfalls eosinophil verändert. Ähnliches bot sich bei der Kontrollgruppe.

Auch in den Kerngebieten des Kleinhirns zeigten sich Nekrosen der Neuronen. Es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Aufgrund der Größe der Neurone schienen sich nekrotische Veränderungen in allen Gruppen darzustellen. Die Steroidgabe scheint keinerlei Einfluss auf das Schädigungsmuster im Kleinhirn zu haben.

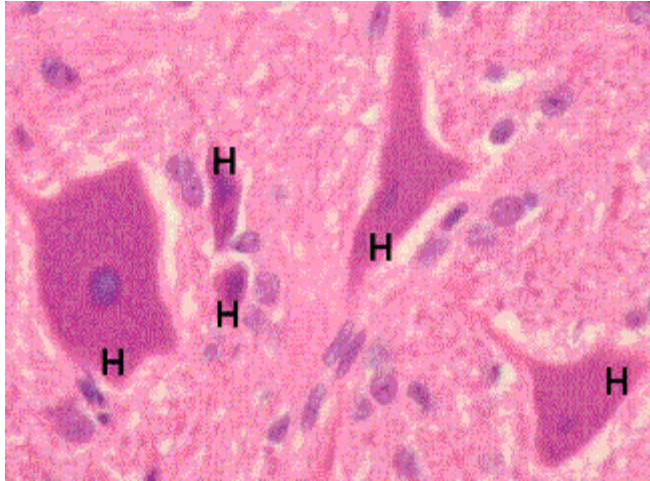


Abbildung 4-30: Nekrose im Kerngebiet des Kleinhirn

Verändert sind die großen Neurone aus den medialen Kerngebieten des Kleinhirns: deutlich zu erkennen sind die nekrotisch veränderten Neurone mit Kernpyknose, Eosinophilie und Zellschrumpfung. Schnitt aus der Kontrollgruppe.

4.4 Molekurgenetische Untersuchungen

4.4.1 Bestimmungen des Hitze-Schock-Protein 70

Die Bestimmung der Expression des Hitze-Schock-Proteins 70 im frontalen Kortex ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Expression bei den Tieren ohne CPB oder KSTH (Sham) wurden auf den Wert eins gesetzt und die Abweichung der Expression von HSP 70 in den Versuchstieren in Relation dazu gesetzt. Durch KSTH kam es zu einer Erhöhung der Expression für das HSP 70 in allen Gruppen, die höchsten Werte wurden in der intrathekalen Gruppe verzeichnet. Die intrathekale Steroidintervention führte zu einer signifikanten Zunahme der Expression von HSP 70 gegenüber der Kontrollgruppe und der systemisch behandelten Steroidgruppe. Die systemische Steroidbehandlung führte auch zu einer erhöhten Expression des HSP 70, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

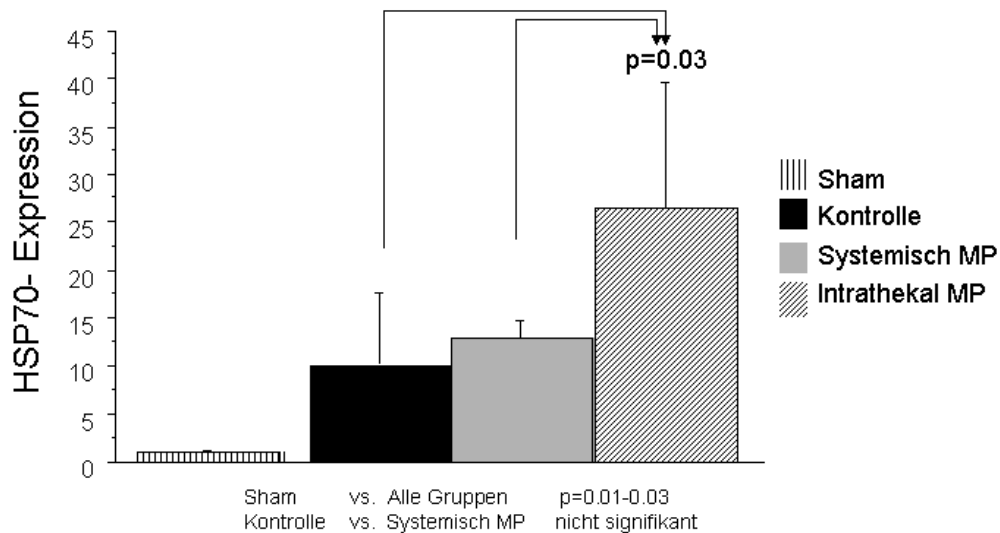


Abbildung 4-31: Expression des Hitze-Schock-Proteins 70kDa.

Dargestellt ist die Genexpression für das HSP 70 im frontalen Kortex. Die Expression von bei den Tieren ohne HLM oder KSTH (Sham) wurde auf den Wert eins festgelegt. KSTH und die systemische Steroidbehandlung führten zu einer nicht signifikanten Erhöhung der Expression des HSP 70. Nur die intrathekale Steroidbehandlung führt zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression des als protektiv geltenden HSP 70 ($p=0.03$).

4.4.2 Bestimmungen der pro-apoptotische Gene Bak und FAS

Bei der Messung der Expression der pro-apoptotischen Gene Bak und FAS konnte ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Gegenüber den Tieren ohne jegliche Operation mit Herz-Lungen-Maschine oder KSTH zeigte sich ein signifikante Zunahme der Expression beider Gene ($p=0.01$). Gegenüber der Kontrollgruppe konnte ein signifikante Zunahme der Expression nur für das intrazelluläre Gen Bak beobachtet werden. Die Expression des extrazellulären FAS-Genes war in der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht. Unter der Steroidintervention kam es dann sowohl zu einer vermehrten Expression für intrazelluläre Stimuli (Bak) als auch extrazelluläre Stimuli (FAS) der Apoptose. Dieses könnte eine molekulare Grundlage für die Induktion der morphologisch sichtbaren neuronalen Apoptose durch eine Steroidbehandlung zu sein. Dabei scheint auch die Applikationsart der Steroide eine Rolle zu spielen, denn die Expression von Bak und FAS war in der systemischen MP Gruppe am höchsten.

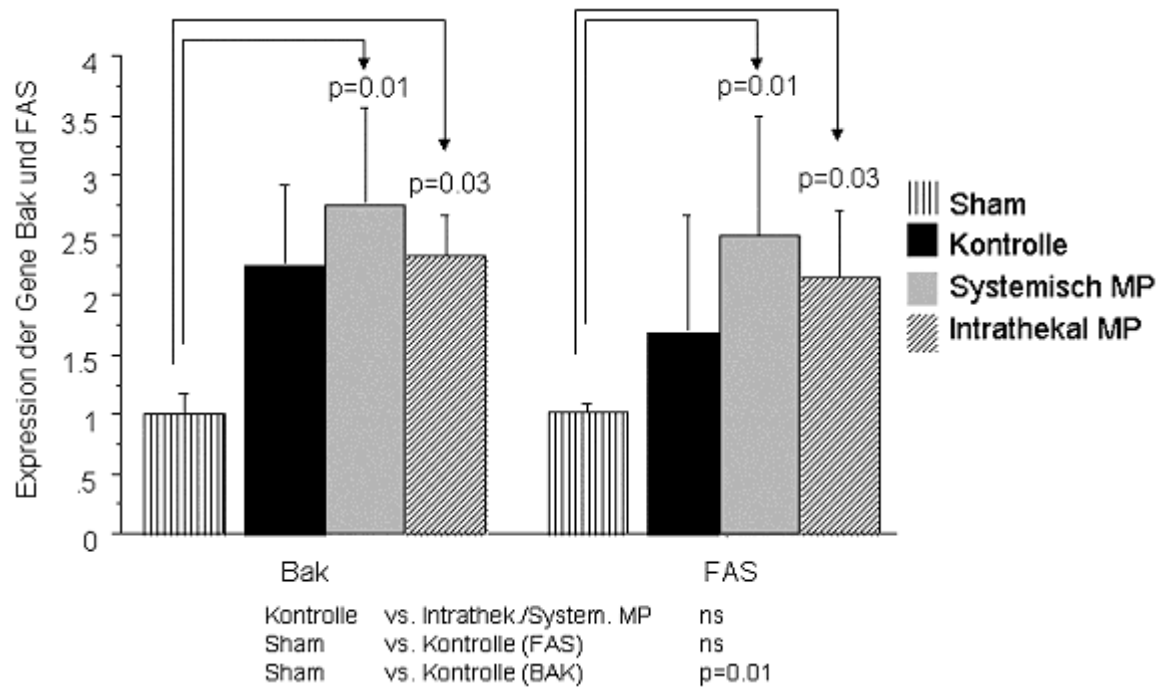


Abbildung 4-32: Expression pro-apoptotischer Gene Bak und FAS

Dargestellt sind die mittels Realtime-PCR gemessene Expressionen der pro-apoptotischen Gene Bak und FAS im frontalen Kortex. Es zeigt sich gegenüber Tieren ohne CPB oder KSTH eine Zunahme dieser Gene in der Kontrollgruppe, welche jedoch nicht signifikant war. Dafür jedoch kam es durch die Steroidgabe zu einer signifikanten Zunahme der Genexpression für Bak und FAS.

4.4.3 Bestimmungen von Bcl-xl als anti-apoptotisches Gen

Die Expression des Bcl- x_L Gens aus der Familie der anti-apoptotischen Bcl-2-Gruppe zeigte sehr ähnliche Werte für die Tiere ohne KSTH und für die Kontrollgruppe mit CPB und 120 Minuten KSTH. Zu einer Erhöhung der Genexpression für Bcl- x_L kam es durch die Intervention mit Steroiden, wobei nur in der intrathekalen Gruppe ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe entstand ($p=0.03$). Ermittelt wurden die Werte mittels Realtime-PCR, die Expression in den Tieren ohne KSTH diente zur Ermittlung der normalen Expression und wurde auf eins festgesetzt.

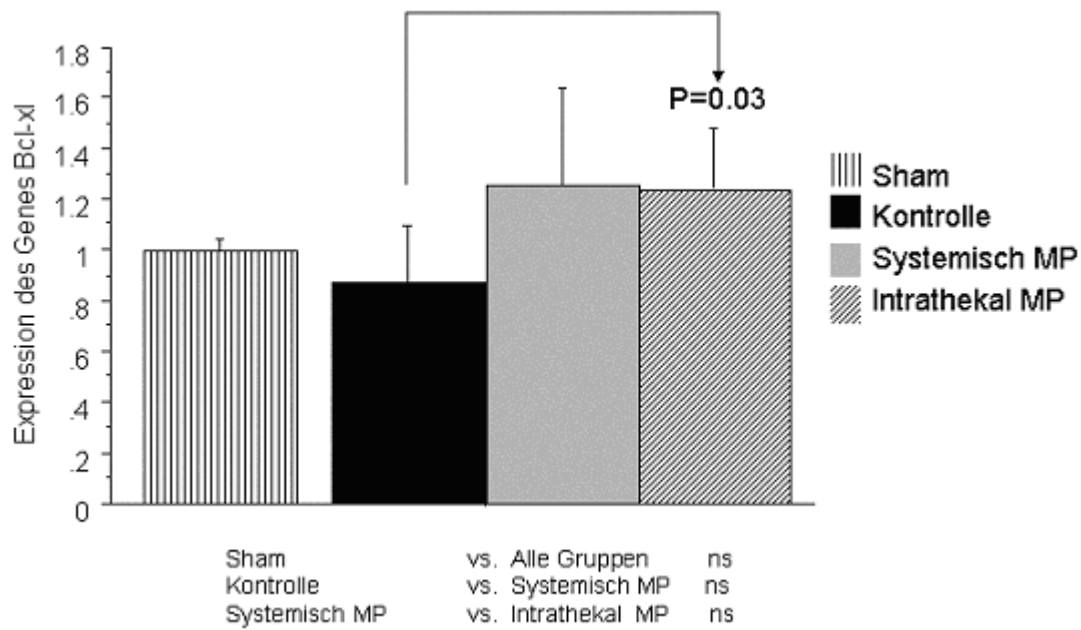


Abbildung 4-33: Expression des anti-apoptotischen Bcl-xl-Gens

Dargestellt ist die mittels Realtime-PCR gemessene Expressionen des anti-apoptotischen Gens Bcl-xl im frontalen Kortex. Es zeigt sich gegenüber Tieren ohne CPB oder KSTH (auf den Wert eins gesetzt) eine geringe Zunahme der Expression dieser Gene in den beiden Steroidgruppen, wobei sich nur die Zunahme in der intrathekalen Gruppe mit $p=0.03$ gegenüber der Kontrollgruppe signifikant unterschied.

5 Diskussion

In der vorliegenden experimentellen Arbeit konnte demonstriert werden, dass im Zusammenhang mit Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie und CPB eine morphologisch sichtbare Schädigung auf zerebraler Ebene reproduzierbar ist. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es bei der chirurgischen Korrektur angeborener Herzfehler im Neugeborenen- und Kleinkindalter auch unter systemischer Hypothermie es bei einer verlängerten Kreislaufstillstandszeit zu einer Beeinträchtigung der zerebralen Funktion kommen kann, mit daraus resultierender morphologischer Schädigung. Die Inzidenz dieser zerebralen Veränderungen beeinflusst wiederum entscheidend die spätere kognitive Leistung und psychomotorische Entwicklung der operierten Kinder^{1;8}.

Es besteht somit die Notwendigkeit die zugrundeliegenden Pathomechanismen der zerebralen Alterationen aufzudecken und entsprechende Strategien zum Schutz des Gehirns zu entwickeln. Diese Arbeit sollte der Beschreibung der morphologischen Veränderungen im Gehirn nach verlängertem hypothermen Kreislaufstillstand von 120 Minuten dienen. Anhand des detektierten Schädigungsmusters sollte in einem zweiten Schritt der Einfluss einer Behandlung mit Methylprednisolon auf die Prävention einer neuronalen Schädigung quantitativ überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde ein neonatales Tiermodell entworfen, welches die Gegebenheiten in der Klinik möglichst realitätsgetreu widerspiegelt. Die Ergebnisse bei verlängertem KSTH sollten dann auch Ansätze bilden für eine zerebrale Protektion bei wesentlich kürzeren Kreislaufstillstandszeiten.

Orientiert wurde sich beim Entwurf des Studiendesigns aber auch an anderen experimentelle Studien. Kreislaufstillstandszeiten von 90 bis 120 Minuten wurden in einigen experimentellen Studien zur Erforschung der zerebralen Veränderungen angewendet^{152;160;161}. Aber auch im klinischen Alltag können bei sehr komplexen Operationen, wie z.B. bei der Korrektur des hypoplastischen Linksherzsyndroms, Kreislaufstillstandszeiten von 60 bis zu 80 Minuten durchaus notwendig sein. Insgesamt konnte mit diesem Modell aber erst einmal gezeigt werden, dass eine Erhebung eines organspezifischer Schädigungsmuster nach KSTH und die Evaluation einer neuroprotektiven Intervention gut möglich ist¹¹⁶. Bisher haben nur Kurth und Fessatidis et al. ein neonatales Modell zur Erforschung der zerebralen Veränderungen im Zusammenhang mit CPB und KSTH mit anschließender morphologischer Analyse des ZNS etablieren können^{21;87}.

5.1 Rolle der Steroide in der Organprotektion

Steroide und speziell das Methylprednisolon werden schon seit 1966 in der Herzchirurgie eingesetzt, ursprünglich mit dem Ziel eine reaktive Vasokonstriktion und eine kardiale Dysfunktion nach CPB zu beeinflussen^{124;125}. Ein protektiver Einfluss von Methylprednisolon auf das Herz wurde bei anoxischem Herzstillstand beschrieben, wobei die Vorbehandlung mit MP zur Vermeidung einer pathologischen Kontraktur des Herzmuskels nach elektromechanisch ausgelöstem Herzstillstand führte¹⁶².

Durch die Erkenntnisse über eine Induktion inflammatorischer Kaskaden und der Entstehung eines generalisierten Ödems nach zerebraler Ischämie und Reperfusion wurden die Steroide in den letzten Jahrzehnten auch zur Neuroprotektion eingesetzt. Seitdem wird ein neuroprotektiver Effekt von Steroiden, wie z.B. Methylprednisolon (MP), in Zusammenhang mit zerebraler Ischämie in vielen Studien kontrovers diskutiert^{121;163-168}. Zur Evaluation eines neuroprotektiven Effekts einer Steroidbehandlung wurden verschiedene Modelle mit fokaler und globaler zerebraler Ischämie entworfen^{121;169-171}. Steroide wurden dabei eingesetzt zur Vorbeugung und Behandlung einer inflammatorisch bedingten Zellschädigung, Permeabilitätsstörung und zur Prävention eines zellulären und interstitiellen Ödems¹²⁰⁻¹²³. Der hemmende Einfluss auf die Entstehung eines interstitiellen Ödems konnte durch eine Vielzahl klinischer und experimenteller Studien nachgewiesen werden^{22;129;166;169}. Ob jedoch eine Ödemprävention mit einer Zellprotektion gleichzusetzen ist, bleibt fraglich. Die erwünschte Wirkung der Steroide besteht unter anderem aus einer Hemmung der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren. Steroide wirken hemmend auf Makrophagen und auf die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF-alpha, IL-6 und IL-8^{53;131;132}. Dadurch kommt es zu einer geringeren Komplementaktivierung^{53;131;132}. Gleichzeitig erhöhen sie die Konzentration anti-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. von IL-10^{54;55}. Bei Annahme einer entzündlichen Genese der Nervenzellschädigung nach CPB interpretierten einige Studien die Reduktion der pro-inflammatorischen Parameter nach Steroidgabe als neuroprotektive Wirkung¹²⁶⁻¹²⁸. Jedoch wurden in keiner Studie zusätzlich die morphologischen Veränderungen untersucht.

Aber die Kontroverse über einen neuroprotektiven Effekt durch Reduktion der inflammatorischen Antwort durch Steroidgabe bestand weiter durch die vor allem gegensätzliche Ergebnisse aus klinischen Studien. Dabei beschrieb Andersen et al. z.B. in einer klinischen Studie zwar eine Reduktion der Komplement-Aktivierung während CPB unter einmaliger intravenöser „high-dose“ Steroidtherapie, es fehlte jedoch ein signifikanter Unterschied im Outcome der Patienten¹³⁷. Boscoe et al. zeigten, dass weder Steroide noch pulsatile HLM-Fluss die Komplement-Aktivierung unter CPB beeinflussen¹³⁸. Karlstadt et al. untersuchten den Einfluss der Steroide auf eine Endotoxin-Entstehung während CPB und stellten fest, dass Methylprednisolon die Entstehung des Plasma-Endotoxins nicht beeinflusst¹³⁹.

Ebenfalls konnte durch die Steroidbehandlung in anderen experimentellen neurologischen Studien eine Verminderung exzitatorischer Aminosäuren nach zerebraler Ischämie beobachtet werden^{20;122;128;133}. Zusätzlich konnte in einigen Studien auch ein antioxidativer Effekt durch die Steroide beschrieben werden^{121;130}. Und Simard et al. konnten auch einen protektiven Einfluss des Methylprednisolons auf die Astrozyten nach zerebraler Ischämie nachweisen¹⁶⁶. Dabei scheint MP die astrozytäre Calcium-Homöostase zu stabilisieren, und damit eine astrozytäre Dysfunktion mit einem Anstieg des für die Neuronen toxischen extrazellulären Calcium's zu verhindern¹⁶⁶.

In den meisten klinischen und auch experimentellen Studien fehlen jedoch vor allem ausführliche morphologische Untersuchungen, um eine neuroprotektive Wirkung durch die Applikation der Steroide wirklich beweisen zu können. Um einen neuroprotektiven Effekt der systemischen Steroidgabe wirklich nach-

zuweisen, bedarf es vor allem einer morphologischen Analyse im Gehirn nach Steroidapplikation im Zusammenhang mit einer hypoxisch-ischämischen Schädigung.

Die Vorbehandlung mit Steroiden mit einer „high-dose“ intravenösen MP-Gabe von 30 mg/kg vor einem ischämischen Ereignis, wie z.B. Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (KSTH), wird diskutiert ^{22;172;173}. Nach der Vorbehandlung mit Steroiden und nach 100 Min. KSTH zeigte sich in einer Studie eine deutliche Reduktion des Körperödems, eine Verbesserung der vaskulären Funktion und eine Reduktion apoptotischer Zellveränderungen im ZNS ²². Jedoch zog diese Studie keinen Vergleich zu Tieren ohne Steroidapplikation und es fand nur eine immunhistochemische Analyse mit Anfärbung des „transforming growth factor- β 1“ (TGF- β 1) und des Apoptose-Markes Caspase-3 statt. Auf eine ausführliche quantitative regionale Analyse der neuronalen Veränderungen wurde verzichtet.

Ebenso berichtete eine Arbeitsgruppe der Duke-Universität von einer Reduktion der Immunantwort nach der Vorbehandlung mit hochdosierten Steroiden 8 Stunden vor dem CPB, verglichen mit der herkömmlichen intraoperativen Applikation in der Primeflüssigkeit des CPB ¹³⁶. Die präoperative Applikation führte zur einer verbesserten Lungenfunktion durch verminderte pulmonale Wasserakkumulation: eine ähnliche Wirkung konnte auch im Gehirn durch Reduktion des perivaskulären Ödems und Verbesserung der zerebralen Hämostase aufgrund dieser Ergebnisse vermutet werden.

Auch die Ergebnisse einer Studie von Langley et al., welche den Einfluss einer Vorbehandlung mit hochdosiertem Methylprednisolon auf den zerebralen Blutfluss und die Oxygenation nach 60 Minuten KSTH untersuchten, fanden eine statistisch signifikante Erhöhung der regionalen zerebralen Perfusion nach CPB und KSTH. Auch hierbei fehlte jedoch eine histologische Evaluation post mortem, sowie weiterführende neuropsychologische Untersuchungen, die notwendig wären, um wirklich einen neuroprotektiven Effekt beschreiben und quantifizieren zu können ²⁰. Die Veränderungen der zerebralen Perfusion und Oxygenation so kurz nach KSTH, stellen jedoch eher eine physiologische Variationen mit zugrundeliegender Kopplung aus Metabolismus und Perfusion dar, als ein Anzeichen für das Vorliegen einer signifikanten Organprotektion ^{17;135}.

Chaney et al. stellte nach Methylprednisolongabe eine Verschlechterung der Hämodynamik und des Outcome nach während CBP fest ¹⁷⁴. Auf eventuelle Nebenwirkungen einer Steroidtherapie vor allem im Neugeborenen- und Kleinkindesalter weisen aktuelle klinische Studien hin. Gerade durch eine postnatalen Steroidapplikation zur Behandlung einer Lungenunreife, konnten Störungen der neurologischen Entwicklung und des Verhaltens beobachtet werden ¹⁴⁰.

5.2 Vergleich der drei Versuchsgruppen

Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in ihren allgemeinen Parametern wie Gewicht, Alter oder Größe. Die relativ kleinen Versuchsgruppen waren bedingt durch die äußerst komplizierte Durchführung der Versuche und es wurde daher auch aufgrund strenger Kriterien eine große Anzahl von Tieren

ausgeschlossen. Insgesamt wären natürlich größere Gruppen statistisch wünschenswert, aber aufgrund der technischen Durchführbarkeit und der komplexen Bedingungen der Untersuchungen gestaltete sich dieses schwierig. Die intrathekal behandelte Gruppe ist mit 5 Tieren die kleinste, doch waren ihre Ergebnisse statistisch mit der geringsten Varianz versehen.

5.3 Morphologische Veränderungen des ZNS ohne Steroidbehandlung

Um einen neuroprotektiven Effekt überprüfen zu können war es notwendig, die zerebralen Veränderungen nach Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (KSTH) und CPB zu beschreiben. Das Schädigungsmuster nach 120 Minuten KSTH ohne jegliche protektive Intervention bestand aus deutlichen und quantifizierbaren morphologischen Veränderungen auf astroglialer und neuronaler Ebene, mit einem regional unterschiedlichen Verteilungsmuster in den einzelnen Hirnbereichen. Die Ausprägung und die Genese von astroglialer Zellschädigung, sowie Nekrose und auch Apoptose der Neuronen ist sicherlich multifaktoriell bedingt und steht vorwiegend im Zusammenhang mit dem verlängertem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie.

Für die Manifestation der morphologischen Veränderungen im Sinne neuronaler Nekrose und Apoptose waren bei dieser experimentellen Untersuchung das Erreichen einer postoperativen Überlebenszeit von 6 Stunden wichtig. Kurth et al. zeigte in seinen Untersuchungen ein Maximum der sichtbaren morphologischen nekrotischen und apoptotischen Veränderungen nach 6 postoperativen Stunden, wobei er nach 90 Minuten KSTH morphologische Untersuchungen mit unterschiedlichen postoperativen Zeitintervallen von 6 Stunden, 2 Tagen und 1 Woche durchführte⁸⁸.

Sicherlich wären bei noch längerem postoperativen Überlebenszeitfenster eventuell noch weitere Veränderungen zu erwarten gewesen, wie reaktive Veränderungen mit Gliose und zusätzliche immunologische Reaktionen. Wegen des komplexen Versuchsaufbaus war ein Aufwachen der Tiere und eine Entwöhnung so kurze Zeit nach dem Eingriff nicht möglich. Für ein weiteres Überleben der Tiere über 6 Stunden hinaus wäre weiterhin eine intensivmedizinische Überwachung mit Beatmung und ein komplettes intensivmedizinisches Monitoring erforderlich gewesen. Bei einer längeren postoperativen Überlebenszeit können auch zusätzliche Komplikationen unabhängig vom Versuchsaufbau, wie Blutungen, Infektionen, metabolische Störungen und hämodynamische Störungen, auftreten.

Wichtig zu erwähnen ist, dass die Dauer des KSTH einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung und das Ausmaß der Neuronenveränderungen zu haben scheint. So stellten Fessatidis et al. schon nach 45 Minuten eine Zellschädigung in Form einer neuronalen Nekrose fest, während Kin et al. diese erst nach 90 Minuten beobachteten^{94;95}. Einen sehr großen Einfluss scheint aber auch das Perfusionsprotokoll zu haben, wobei während eines „full-flow“-CPB eine Ischämie nicht zu erwarten ist.

5.3.1 Veränderungen der Astrogliazellen

Im Rahmen der Versuche konnte gezeigt werden, dass nach KSTH nicht nur die Schädigung der Neuronen im ZNS eine wesentliche Rolle spielt, sondern auch die Veränderungen der Astrogliazellen, welche einen sehr wesentlichen Bestandteil aller Zellen im ZNS darstellen.

In den von uns durchgeführten Vorversuchen am Kaninchen und am Ferkel konnten wir nach 60 Minuten KSTH kaum ischämische Veränderungen der Neuronen feststellen¹⁷. Dagegen lag eine deutliche primäre Schädigung auf Ebene der Gliazellen. Diese Veränderungen der Gliazellen konnten aber auch nach 120 Minuten KSTH beobachtet werden, zusätzlich zeigten sich aber dann auch die neuronalen Veränderungen.

Die Veränderungen der Astrozyten sind durch eine zelluläre Schwellung gekennzeichnet. Aus dieser Schwellung resultiert sicherlich ein Funktionsverlust. Die Gliazellen zeigen topographisch eine enge Beziehung zu den kleinen Gefäßen des ZNS. Sie umgeben die Gefäße mit ihren Fortsätzen und bilden einen sehr wesentlichen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke¹⁷⁵. Darüber gewähren sie die nutritive Funktion für die Neuronen und schützen die Neuronen durch die Metabolisierung von extrazellulären Glutamat und anderen Neurotransmittern vor einer excitotoxischen Schädigung^{176;177}.

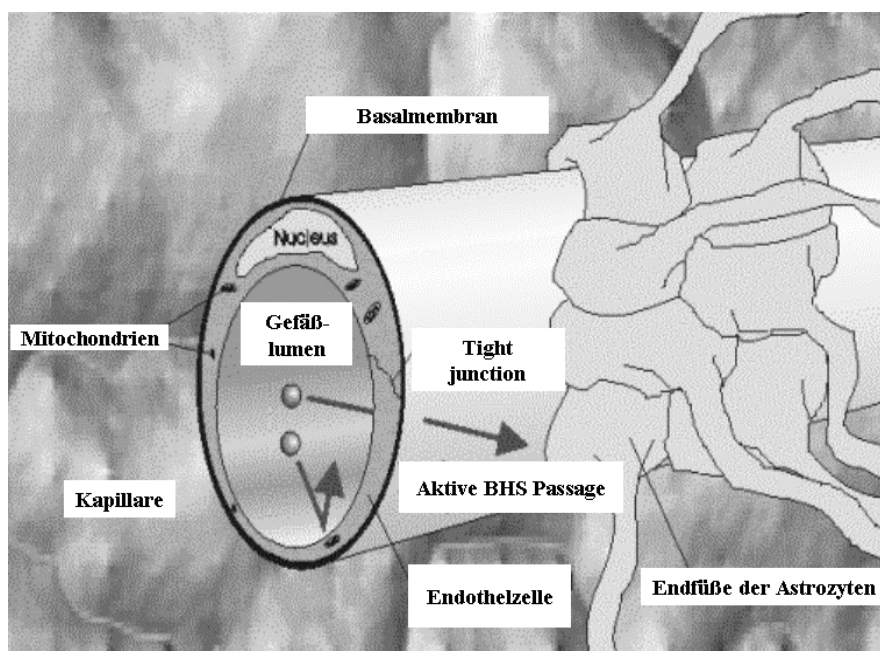


Abbildung 5-1: Beziehung der Astrozyten zu den Gefäßen des ZNS

In vitro konnte eine astrozytäre Schwellung in Versuchen mit Zellkulturen durch Hypothermie, Hypoglykämie und Azidose hervorgerufen werden^{175;178-180}. Es konnten dabei komplexe Zusammenhänge zwischen der Störung des Glutamat-Metabolismus der Astrozyten während Hypothermie und einer astroglialen Schwellung nachgewiesen werden^{176;180}. Als Ursache der astroglialen Schwellung können somit Glutamat-Toxizität und Ionen-Imbalance angeführt werden, welche zu Veränderungen im Membranpotential der Astrozyten und einer resultierenden Schwellung führte¹⁸⁰⁻¹⁸². Die astrogliale Schwellung während

Hypothermie konnte jedoch durch eine Hyperoxie gemildert werden¹⁸⁰. Somit scheint neben der Ischämie auch die Hypothermie an sich eine Rolle bei der Gliazellschädigung zu spielen.

Nach 120 min. KSTH zeigte sich eine deutliche astrozytäre perivaskuläre Ödembildung, welche möglicherweise ebenfalls sekundär mit einer Verschlechterung des Neuronenstoffwechsel verbunden ist¹⁷. Die Bestimmungen spezifischer astroglialer Proteine wie des Protein S100B in Serum und Liquor können auf morphologische und funktionale Alterationen der Astrogliazellen hinweisen⁴⁸. Die Ergebnisse der Bestimmung des astroglialen Proteins S100B bei KSTH wurden bereits publiziert¹⁷.

5.3.2 Neuronale Nekrose

Die Ergebnisse unserer experimentellen Untersuchung ergaben, dass ein verlängerter KSTH von 120 Minuten zu der Entstehung von Nekrose und auch Apoptose der Neuronen im ZNS mit einer regional unterschiedlichen Ausprägung führt. Bei der genauen Betrachtung der einzelnen Hirnregionen zeigte sich ein deutlicher Fokus der Schädigung im Bereich des Hippocampus, des Kleinhirns und des Neokortex, bei geringer ausgeprägten Veränderungen in den Stammganglien und den anderen Bereichen des ZNS. Es zeigte sich damit eine Abweichung gegenüber früheren Studien mit KSTH und einer morphologischen Analyse des ZNS^{94;99}. Während bei den anderen Studiengruppen der Fokus der Schädigung vorwiegend im Sektor CA 1 lokalisiert war, zeigten die neuronalen Zellveränderungen in unserer Studie eine regional unterschiedliche Ausprägung. Der Hippocampus war in unserer Studie betroffen mit den Abschnitten CA 1-4 und Gyrus dentatus. Somit konnten in unserer Studie sehr ähnliche Ergebnisse erzielt werden, wie in der Studie von Kurth et al⁸⁸. Nur wenige experimentelle Studien führten eine regionale morphologische Untersuchung des Gehirns nach KSTH durch. Die meisten Studien begnügten sich jedoch dabei auch mit nur der Erhebung eines „Scores“ und somit einer semiquantitativen Auswertung^{58;183-185}.

Der Hippocampus bildet als Teile des limbischen Systems die Grundlage der kognitiven Kombinationsanwendung und des Langzeitlernens. Er bietet ein gutes Beispiel dafür, wie Neuronen abhängig von ihrer funktionaler und regionaler Zugehörigkeit eine unterschiedliche Reaktion auf eine Ischämie-Reperfusion zeigen können^{88;186}. Die Neuronen des Gyrus dentatus zeigten nach KSTH von 120 Minuten vor allem einen Zelluntergang in Form eines programmierten Zelltodes (Apoptose), wobei ca. 10 % der Neuronen verändert waren. Die Neurone des CA 1– CA 4 wiesen eine Zellschädigung in Form von Nekrose auf mit teilweise 70 % Anteil geschädigter Neurone. Über die Ursache der unterschiedlichen regionalen Manifestationen der Schädigung im Gehirn kann nur spekuliert werden. Funktionale und auch strukturelle Unterschiede der einzelnen Neuronengruppen im Hippocampus könnten, was in der Literatur als „selektive Vulnerabilität“ angegeben wird, für die unterschiedlichen Zellveränderungen verantwortlich sein^{118;186;187}. Die Analyse des Hippocampus für nekrotische Neuronenveränderungen, als Ort der „selektiven Vulnerabilität“ nach Ischämie ist sehr gängig, doch in vielen Studien wurden meist nur das CA1 und nicht auch die anderen Bereiche CA 2 – CA 4 untersucht^{94;186;188}. Ein nekrotischer Zelltod kommt gegenüber einem kontrollierten und morphologisch abgrenzbaren apoptotischen Zelltod durch eine fulminante Störung der

Mitochondrienfunktion mit einem exzessiven Calcium-Einstrom, sowie einer Toxizität durch verschiedenen Metaboliten, wie z.B. Glutamat, zustande. Dieser Vorgang führt zu einer Reduktion der notwendigen zellulären Energie-Produktion und schließlich zum zellulären Energiemangel mit dem Erliegen der so wichtigen Zellhomöostase^{59;60;189-191}. Es gibt einige Hinweise, dass auch die Hyperglykämie einen Einfluss auf die Entstehung und Verstärkung einer selektiven neuronalen Nekrose besitzt¹⁸⁶.

Die in unserer Untersuchung dokumentierten neuronalen Veränderungen geben einen Hinweis darüber, dass es trotz einer erwiesenen neuroprotektiven Wirkung durch die Hypothermie, bei längeren Stillstandzeiten größer 60 Minuten zu einer möglichen Limitation der protektiven Wirkung kommen kann. Daraus resultiert ein Schädigungsmuster in Form neuronaler Nekrose und Apoptose.

Im Kortexbereich gab es ebenfalls eine unterschiedliche Verteilung für die vor allem nekrotischen Neuro-
nenveränderungen, welche sich als abhängig von der Zugehörigkeit zu den einzelnen Schichten und der Neuronengröße zeigte. Je größer die Neuronen waren, desto mehr Schädigung zeigten sie. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Studien berichtet, wobei in der Studie von Kurth et al. erstmals die apoptotischen Veränderungen im Vordergrund standen^{88;192}.

Im Kleinhirn dominierten die nekrotischen Veränderungen der großen Purkinje-Zellen. Es zeigte sich eine deutliche Schädigung mit teilweise 70 – 80 % nekrotischer Zellen. Das Kleinhirn wurde in anderen Studien mit KSTH selten betrachtet. Ein so hoher Anteil der hypoxisch-ischämischen Veränderungen wurde in Studien mit normothermer Ischämie beschrieben¹⁸⁸. In der Studie von Kurth et al. zeigten sich ebenfalls nekrotische Veränderungen im Kleinhirn, jedoch war der Anteil der Schädigung mit ca. 25 % geringer⁸⁸.

Die Veränderungen im Bereich der Stammganglien waren durch eine moderate Schädigung geprägt und unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Diese Ergebnisse decken sich gut mit denen anderer Studien, in denen die Stammganglien keine wesentliche neuronale Schädigung aufwiesen^{88;192}.

5.3.3 Neuronale Apoptose

Der Begriff Apoptose stammt aus dem griechischen und bedeutet „Herabfallen der Blätter im Herbst“. Er wurde durch Kerr und seine Mitarbeiter eingeführt. Sie beschrieben damit neben der Nekrose als passive Form die aktive Form des Zellunterganges¹⁰⁵. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein energieabhängiger Prozess des Zellunterganges, welcher während der embryonalen Entwicklung und in dem sich regenerierendem Gewebe physiologisch vorkommt¹⁹³. Morphologisch zeichnet sich die Apoptose durch Kernfragmentation, Zellschrumpfung und Bildung „apoptotischen Körperchen“ bei initialem Erhalt der Zellorganellen und der Zellmembran aus¹⁰⁰. Der apoptotische Zelltod wird auch „programmierter“ Zelltod genannt. Er wird durch eine mitochondriale Dysfunktion und durch Freisetzung von Cytochrom C als „Apoptose-induzierendem Faktor“ aus den Mitochondrien getriggert^{112;189}. Sind die Mitochondrien nach einer Ischämie-Reperfusion einer Akkumulation von intrazellulären Calcium oder Sauerstoffradikalen ausgesetzt, öffnen sich in der mitochondrialen Membran die „Ca⁺⁺Poren“ („mitochondrial permeability

transition pore“). Dadurch gerät das Membranpotential aus dem Gleichgewicht und es kommt zu einem Versagen der Energie-Produktion. Hieraus resultiert die Freisetzung von Cytochrom C. Cytochrom C aktiviert wiederum eine Reihe von Enzymen der Transkription, wodurch es zur Auflösung und Fragmentierung der DNA kommt, und vor allem die Caspase-Kaskade¹⁹⁴. An den Mitochondrien befinden sich auch das anti-apoptotischen Protein Bcl-X_L und weitere Vertreter der anti-apoptotischen Bcl-2-Familie¹⁹⁵. Diese können durch Interaktion mit dem Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor 1 (APAF-1) die Aktivierung der Caspase-Kaskade hemmen¹⁹⁶. Ob es zum programmierten Zelltod kommt oder nicht, wird durch eine Vielzahl von Proteinen und Mediatoren reguliert. Das Verhältnis der anti- und pro-apoptotischer Proteine ist u.a. ausschlaggebend. Ein Überwiegen der pro-apoptotischen Proteine Bax und FAS und ein Fehlen des anti-apoptotischen Proteins Bcl-X_L führt demnach zur Induktion der Apoptose¹⁵⁰.

Aber im Rahmen einer Ischämie-Reperfusion können auch externe Stimuli wie TNF, lösliches Fas, toxische Produkte, Peroxide, Sauerstoffradikale oder NO via Rezeptoren in der Zellmembran zu einer Aktivierung des intrazellulären Caspase-Systems führen^{59;114}.

Das Auftreten apoptotischer Veränderungen im Hippocampus nach Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie wurde erst in neueren Studien von Kurth und Cooper et al. beschrieben^{83;88}.

Unsere Ergebnisse sind somit übereinstimmend mit den Ergebnissen von Kurth et al.⁸⁸. Die Apoptose als aktive und energieabhängige Form des Zellunterganges trat ohne Steroidbehandlung nur regionalspezifisch im Gyrus dentatus des Hippocampus auf und lag im Durchschnitt bei 9 % der Neuronen. Die Unreife der Zellen im Hippocampus könnten diese spezifische Veränderung und die regionalen Unterschiede bedingen⁸⁸.

5.4 Einfluss der Behandlung mit Methylprednisolon (MP)

Es wurde eine Vorbehandlung mit „high-dose“ Methylprednisolon 4-6 Std. intravenöse und intrathekal präoperativ durchgeführt, um eine mögliche molekulare Induktion spezifischer Steroide induzierter Mechanismen hervorzurufen. Die Vorbehandlung vor dem eigentlichen ischämischen Ereignis sollte eine verbesserte Zellprotektion bewirken. Nach intravenöser Gabe von MP wird die Maximalkonzentration im Organewebe erst nach 1 bis 2 Stunden erreicht, wodurch eine Gabe während des CPB zu spät sein könnte, um eine wirksame Zellprotektion zu erzielen^{22;53}. Dabei ist zu beachten, dass Thompson et al. ein Absinken der Steroidkonzentration im Blut 4 Stunden nach intravenöser Applikation beschrieben hat und somit die Wirkungsdauer begrenzt zu sein scheint^{136;197}. Dieses könnte eine Einschränkung der Vorbehandlung bedeuten und eine weitere Gabe im Rahmen der Reperfusion könnte postuliert werden. Bisher hat jedoch keine Untersuchung zur Evaluation der Pharmakokinetik unter CPB und der unterschiedlichen Applikationsarten stattgefunden und der Einsatz der Steroide im Sinne der Neuroprotektion bleibt weiter ungeklärt.

Über einen Dosis-abhängigen Effekt und auch Nebenwirkungen kann spekuliert werden, aber die in dieser Untersuchung verwendeten 30 mg/kg KG wurden empirisch ausgewählt, gelten in der Literatur aber schon lange als ein Standard für eine „high-dose“ Methylprednisolon Behandlung und wurden auch in anderen Studien verwendet ^{134;173;197-201}.

Die intrathekale MP-Gabe wurde präoperativ ebenfalls einmalig durchgeführt, sie diente der Überprüfung einer von der Permeation über die Blut-Hirn-Schranke unabhängigen Wirkung des MP im ZNS. Bei intrathekaler Gabe gilt eine deutlich höhere Konzentration verglichen mit intravenöser Gabe als wahrscheinlich, wie Untersuchungen beim Schwein zeigen konnten ²⁰². Die Verträglichkeit der intrathekalen Applikation wird auch in der Literatur als unbedenklich angesehen ²⁰³. Einzig durch die Nebensubstanzen wie Polyäthylenglykol wurde einmalig eine Nebenwirkung mit Arachnoiditis beschrieben ²⁰⁴. Die Halbwertszeit für Steroide im Liquorraum ist relativ kurz, für Dexamethason liegt sie nach Angaben bei 2,2 Std ²⁰⁵. Ein Übertritt des MP aus dem Liquor in das Hirngewebe wurde durch Lehrer et al. dokumentiert, wobei das MP vorwiegend in der weißen Substanz nachgewiesen werden konnte ²⁰⁶. Die Fähigkeit zur Passage oder Permeation von MP über die Blut-Hirn-Schranke zeigt eine entscheidende Rolle für die neuroprotektive Wirkung des Methylprednisolons (MP) zu spielen, ist aber weiter ungewiss. Chen et al. veröffentlichten eine Studie bei der sie zeigten, dass MP sich an die Gehirnkapillaren bindet und dann in einem sehr langsamen aktiven sättigbaren Transport die Blut-Hirn-Schranke (BHS) passieren kann, welcher im Zusammenhang mit dem zytoplasmatischen Glukokortikoidrezeptor steht ²⁰⁷.

Aufgrund der Blut-Liquor-Schranke für eiweißgebundene Substanzen, zu denen auch das MP zählt, können nach einer Studie von Uete et al. bei systemischer Applikation im Liquor nur etwa 1/10 der Serumspiegel erreicht werden ²⁰⁸. Die lumbale Applikation erreicht somit deutlich höhere Konzentrationen im Liquor. Die Konzentration im kranialen Anteil der Liquorräume bei lumbaler Applikation ist jedoch weiter unklar ²⁰⁹. Es werden jedoch höchstwahrscheinlich deutlich höhere Konzentrationen erreicht, als bei systemischer Applikation. Trotzdem werden aber lipidlösliche Steroide mit dem Ziel entworfen, eine bessere Passage in das ZNS zu erreichen. Die Permeabilität der Steroide über die BHS bleibt ungeklärt, eine zelluläre Wirkung des MP auf die Neuronen kann nicht sicher nachgewiesen werden. Vielleicht erklärt die nur geringe Permeation in das ZNS die fehlende neuroprotektive Wirkung ^{171;202;207}.

Eine Studie von Abram et al. untersuchte den Effekt einer intrathekalen Steroidgabe und den Einfluss eines lumbalen Dauerkatheters für eine intrathekale Applikation. Dabei konnten sie keinen direkt neurotoxischen Effekt einer intrathekalen Steroidgabe feststellen ²⁰³. Auch in dieser Studie konnte kein morphologisch sichtbarer direkt neurotoxischer Effekt durch die intrathekale Steroidapplikation festgestellt werden.

Die Unterschiede in unseren Ergebnissen bei der Intervention mit intrathekalen Steroide und der daraus resultierenden signifikanten Reduktion der nekrotischen Neuronenschädigung im Vergleich zur Kontroll- und auch zur systemische behandelten Steroidgruppe, weist stark auf einen Unterschied der Wirkungsin-

tensität und der lokalen Verteilung im ZNS hin. Die MP-Wirkung scheint somit davon abhängig zu sein, ob und wie die Steroide das ZNS erreichen.

Als Limitation dieser Studie kann angeführt werden, dass bisher keine Bestimmungen der Steroidkonzentration durchgeführt und in Relation zu den Versuchsergebnissen gesetzt wurden. Diese Untersuchungen stehen noch aus, sind aber geplant.

5.4.1 Häodynamische Veränderungen durch die Steroidbehandlung

Die häodynamischen Untersuchungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Postoperativ kam es phasenweise zu Veränderungen der Perfusion. Eine Auswertung der Perfusions- und Oxygenationsmessungen aus unserem Versuch werden folgen. Einige Aspekte sind zum Teil schon aus vorangehenden Versuchen publiziert ²¹⁰. Die Intervention mit Steroiden scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalparameter zu haben und eine Wirkung der Steroide wie sie in einer Studie von Husum et al, bei der es nach einer schnellen intravenösen Bolusgabe zu einem Absinken des MAD und der SVR kam, konnte nicht beobachtet werden ²¹¹. Dass Steroide den Vasotonus und damit die Perfusion beeinflussen können, zeigte Dietzman et al. in einer Studie, wobei er eine signifikante Vasodilatation durch Steroide beobachtete ²¹². Ob diese Hyperperfusion im Sinne einer Neuroprotektion angesehen werden kann, oder ob es sich nur um eine temporäre reaktive Variation nach einer langen Kreislaufunterbrechung handelt, bleibt fraglich. Die Intervention mit Steroiden führte zu keiner Verbesserung der kardiorespiratorischen Parameter. Die postoperativ erhöhten ZVD-Werte waren sicherlich durch eine temporäre Herzfunktionsstörung vor allem des rechten Herzens im Rahmen einer Ischämie-Reperfusion bedingt, welches sicherlich nach einer Ischämiezeit von 120 Minuten zu erwarten ist ^{50 213}.

Einen Einfluss der Steroidgabe auf den Gesamt-Sauerstoffverbrauch konnten Thompson et al. klinisch feststellen, wobei sie keinen Unterschied in der kardialen Funktion gemessen an dem „cardiac Index“ angaben ¹⁹⁷. Auch die Werte für die Blutgase entsprachen damit den Normalwerten in dieser Tierart und waren den physiologischen Werten beim Menschen sehr ähnlich ^{153;214;215}. Die Hämoglobinwerte bei Ferkeln lagen ebenfalls im Normbereich, der mit 8-11 g/dl niedriger ist als beim Menschen ¹⁵³. In unserer Studie kam es zu keinen signifikanten Unterschiede in den kardiorespiratorischen Parametern ^{41;183}. Der Anstieg der PO₂-Werte in der Kühlung ist bedingt durch die Aufsättigung des Blutes mit Sauerstoff und geringerem Organverbrauch bei sinkender Temperatur, wohingegen die hohen Werte in der Reperfusion und postoperativ mit PO₂-Werten zwischen 200-300 mmHg sich an der oberen Grenze des Normbereiches befanden ¹⁸³. Die Tiere wurden in dieser Phase optimal ventiliert.

5.4.2 Pulmonaler Effekt der Steroidbehandlung

In einigen aktuellen Studien wurde auch über einen möglichen positiven Einfluss des Methylprednisolons auf die Lunge diskutiert, wobei es in den klinischen Studien von Chaney et al. unter MP-Gabe zu einer verlängerten Intubationszeit kam, und postoperativ keine Verbesserungen der statischen und dynamischen

Lungen-Compliance festgestellt werden konnte^{134 216}. Im Gegensatz dazu stellten Lodge et al. eine Verbesserung der pulmonalen Compliance, des pulmonal-vaskulären Widerstandes und des alveolär-arteriellen Gradienten als Maß für eine Oxygenierung der Lunge fest¹³⁶. Die Ergebnisse bezüglich der Wirkung von MP auf die Lungenfunktion bleiben also kontrovers. In unseren Versuchen konnten kein Unterschied der respiratorischen Funktion und der Oxygenationsparameter festgestellt werden.

5.4.3 Hyperglykämie durch die Steroidbehandlung

Die vorliegende tierexperimentelle Untersuchung konnte den Einfluss einer Vorbehandlung mit systemischen Steroiden auf die Entstehung einer persistierenden Hyperglykämie nachweisen. Zusätzlich kam es bei unterliegender Hyperglykämie auch zu einer stärkeren Ausprägung neuronaler nekrotischer und auch apoptotische Veränderungen. Die nur mit dem systemisch verabreichten Methylprednisolon (MP) verbundene Hyperglykämie scheint das Zellschädigungsmuster nach zerebraler Ischämie zu verstärken. Ob diese pathologische Stoffwechselsituation zu einer Mangel- oder Überversorgung der Nervenzellen mit Glucose führt ist unklar. Eine Hyperglykämie als Nebeneffekt einer Steroidtherapie ist vielfach auch in anderen Studien beschrieben worden¹³⁴. Einige Studien führten sogar die Verschlechterung der neuronalen Zellschädigung nach zerebraler Ischämie mit gleichzeitiger Steroidbehandlung auf die Entstehung einer Hyperglykämie und Laktatazidose zurück^{170;186}. Jedoch konnte eine signifikant vermehrte Azidose in unseren Versuchsgruppen nicht beobachtet werden.

Als endogene Ursache für eine Hyperglykämie kann sicherlich die im Rahmen einer stressbedingten Ausschüttung von Katecholaminen und Stresshormonen postuliert werden. Eine zusätzliche externe Glucose-Zufuhr wurde nicht durchgeführt, die Infusionstherapie war standardisiert.

Bei homogener Reduktion des Organverbrauchs unter Hypothermie, kam es auch postoperativ in der systemischen Steroidgruppe zu keiner Erholung der Stoffwechsellage. Der Verdacht liegt nahe, dass sowohl die Zunahme nekrotischer Veränderungen, als auch die zusätzliche vermehrte Entstehung apoptotischer Neuronenveränderungen im Hippocampus durch die unter der systemischen Steroidtherapie aufgetretene Hyperglykämie mitbedingt sein könnte. Denn in der Kontrollgruppe und in der intrathekal behandelten Gruppe zeigten sich bei normal hohen Blutglucose-Werten signifikant weniger apoptotische Zellveränderungen. Eine Hyperglykämie als Nebenwirkung einer intravenösen Steroidapplikation ist in der Literatur in zahlreichen klinischen und experimentellen Studien beschrieben worden^{134;170;217}.

Dass eine Hyperglykämie in Zusammenhang mit einer Ischämie zu einer Vermehrung der nekrotischen Zellveränderungen führt, konnte auch Cherian et al. zeigen²¹⁸. Vannuci et al. stellten zusätzlich fest, dass eine Hyperglykämie während oder nach einer Ischämie des ZNS zu einer Verstärkung des Zellschädigungsmusters führt. Er konnte aber regionalen Unterschiede aufzeigen, wobei der Nukleus Caudatus und die Stammganglien mehr betroffen waren, als z.B. der Kortex. Eine Untersuchung des Hippocampus blieb jedoch aus²¹⁹. Auch Kondo et al. beobachteten nach fokaler Ischämie bei begleitender Hyperglykämie eine Zunahme der nekrotischen Neuronenveränderung im Kortex²²⁰. Die pathophysiologische Grundlage

für den Einfluss der Hyperglykämie auf die Neuronenveränderungen ist sicherlich multifaktoriell bedingt. Eine der Ursachen könnte aber in der Funktionseinschränkung der Blut-Hirn-Schranke nach Ischämie liegen, wie sie Kawai et al. experimentell beobachten konnten ²²¹. Ebenso zeigte eine experimentelle Untersuchung, dass Hyperglykämie im Zusammenhang mit KSTH durch eine vermehrte anaerobe Glykolyse im ZNS zu einer verstärkten intrazellulären Azidose und Laktatazidose führt, aus der dann einer Zunahme der Zellnekrosen resultiert ^{222,223}. Eine weitere Studie von Koide et al. zeigte ebenfalls den Zusammenhang zwischen einer chronischen Behandlung mit Steroiden, die über eine hyperglykämische Stoffwechselleage zu einer vermehrten Laktatazidose und einer vermehrten neuronalen Nekrose führte ¹⁷⁰.

Zusätzlich wurde neben einer mit Hyperglykämie assoziierter vermehrten Entstehung neuronaler Zellnekrose auch eine vermehrte Induktion neuronaler Apoptose im Kortex nach fokaler Ischämie in einem Tiermodell gefunden ^{186,224}. Eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom C durch einer Hyperglykämie geht mit einer Aktivierung der Caspase 3 einher, worauf die Aktivierung der Apoptose-Kaskade folgt und es zu einer Fragmentation der DNA kommt ¹¹³.

Zusätzlich konnte in klinischen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass eine Hyperglykämie zu einem schlechteren Outcome nach CPB und KSTH führte ²¹⁷.

5.4.4 Einfluss der Steroidbehandlung auf den Calciumstoffwechsel

Die Ursache für die unterschiedlich hohen Calciumspiegel in den Versuchsgruppen bleibt unklar. Ein primärer oder auch sekundärer Einfluss von Methylprednisolon auf den Calciumstoffwechsel kann postuliert werden ^{225,226}. Aber Steroide führen via die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptoren zu einem erhöhten Einstrom von Calcium in die Zelle ²²⁷. Eine Erhöhung des intrazellulären Calcium führt wiederum zu einer gestörten Funktion der Mitochondrien und zu einer Alteration der zellulären Energieproduktion, wodurch es zu einer Aktivierung hydrolytischer Enzyme und zu einer zytoskeletalen Degradation mit anschließender Zellnekrose kommt ¹⁸⁹. Auch Kristian und Siesjo et al. zeigten den Zusammenhang zwischen dem Anstieg des freien Calcium in der Zelle nach Ischämie und einer reaktiven Aufnahme des Calciums in die Mitochondrien. Im Rahmen des „Calcium-Overloading“ kommt es zu einer gestörten Funktion der Mitochondrien, woraus eine Überflutung des Zytoplasmas mit Calcium folgt mit resultierender Zellschwellung und Zellnekrose ²²⁸⁻²³¹. Eine geringere Calciumfreisetzung und Hypokalzämie kann somit eine Ursache sein für eine weniger ausgeprägte calcium-induzierte Glutamatoxizität und weniger nekrotischen Neuronenschaden ⁶⁰.

Calcium besitzt einen direkten Effekt auf intrazelluläre Proteine und bewirkt durch Interaktion mit deren Phosphorylierungszustand eine Aktivitätsänderung von Enzymen, Rezeptoren und Genen ^{60,189}.

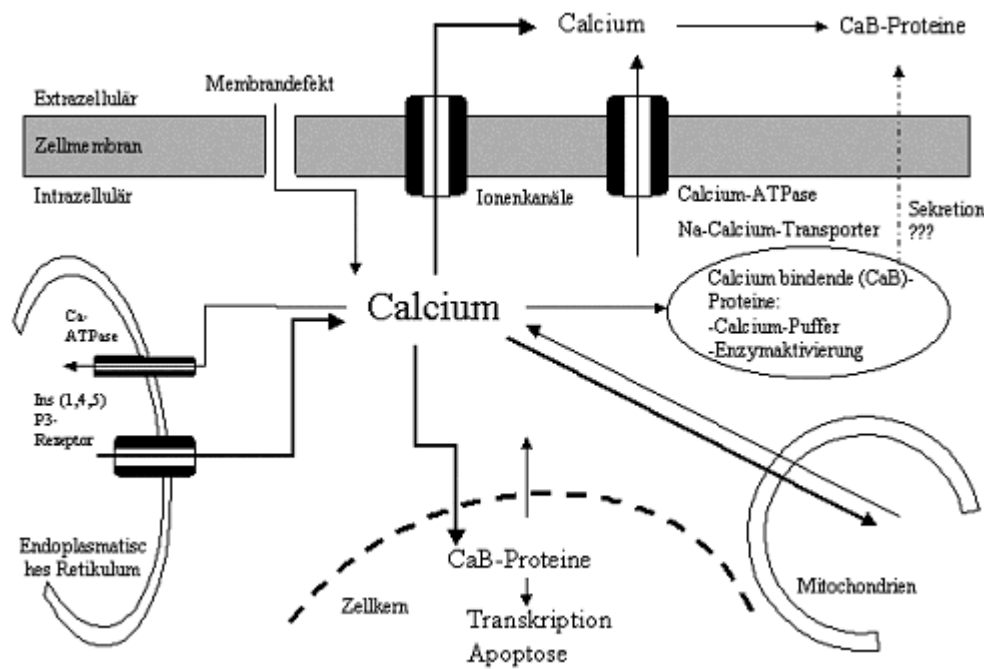


Abbildung 5-2: Zellulärer Calciumstoffwechsel

Eine weitere Wirkung der Steroide wird über die Steroidrezeptoren der Astrozyten hervorgerufen, wobei hier vor allem die Ca^{++} Homöostase beeinflusst wird¹⁶⁶. Der Unterschied zwischen systemischer und intrathekaler Applikation könnte sein, dass das an Albumin gebundene MP bei systemischer Applikation mit den Steroidrezeptoren der Endothelzellen interagiert und darüber, ohne die Blut-Hirn-Schranke überwunden zu haben, in die Calcium-Homöostase der Astrozyten eingreift. Dieses könnte eine Reduktion des perivaskulären Ödems bewirken¹⁶⁶. Methylprednisolon führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration der ruhenden astrozytären Zelle, bewirkt eine Verstärkung der Calcium-getriggerten Signalantwort der Astrozyten und führt zu einer verstärkten Aufnahmefähigkeit der Astrozyten für Calcium¹⁶⁶. Damit sind die Astrozyten in der Lage einen interstitiellen Calciumkonzentrationsanstieg teilweise zu kompensieren, bevor er die Neuronen beeinflusst. Dieses wurde bisher als ein Teileffekt einer neuroprotektiven Wirkung interpretiert¹⁶⁶.

5.4.5 Ödemprävention durch Steroidbehandlung

Eine Quantifizierung des zerebralen Ödems wurde in unserer Untersuchung nur indirekt über die Veränderungen des Hirngewichtes durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3.1.). Es zeigte sich unter der systemischen Steroidbehandlung postoperativ eine signifikant geringere Gewichtszunahme und auch ein geringeres Hirngewicht ($p=0.01$). Die morphologische Analyse ergab auch semiquantitativ ein etwas geringer ausgeprägtes zerebrales Ödem bei den Tieren mit systemischer Steroidapplikation. Die Interaktion der Steroide mit den Astrogliazellen und auch die Prävention eines zerebralen Ödems bleiben jedoch weiter unklar. Ob z.B. Steroide durch eine Beeinflussung des Calcium-Metabolismus in den Astrozyten eventuell

eine toxische Calciumwirkung verhindern und somit auch eine Zellschwellung verhindern, bleibt unklar^{166;211}.

5.4.6 Neuronale Nekrose nach Steroidbehandlung

Die quantitative Auswertung der neuronalen Veränderungen ergab, dass die Behandlung mit systemischen Steroiden nicht den gewünschten Effekt einer signifikanten Reduktion des neuronalen Schädigungsmusters bewirken konnte, jedoch bei der intrathekalen Gabe des MP eine deutliche Verbesserung des Schädigungsmusters erreicht werden konnte. Ein möglicher neuroprotektiver Effekt einer Behandlung mit Methylprednisolon zeigt somit eine deutliche Abhängigkeit von der Applikationsart.

Unsere Ergebnisse sprechen bei Betrachtung des morphologischen Schädigungsmusters nach Applikation des MP im Rahmen von KSTH gegen einen postulierten protektiven Effekt der Steroide vor allem im Zusammenhang mit einer Vorbehandlung^{20;136}. Hier lässt sich aber somit auch eine Übereinstimmung mit anderen Studien finden, die ebenfalls eine generelle Zellprotektion durch Steroidgabe im Rahmen einer zerebralen Ischämie anzweifeln und bei denen es auch zu einer deutlichen Verstärkung der ischämischen neuronalen Schädigung kam^{167;170;232}.

Der neuroprotektive Effekt der systemischer MP-Gabe hängt überwiegend von der Passage der Albumin gebundenen Steroide über die BHS in das ZNS ab. Bei intrathekalen Gabe und einer vermutlich erhöhten Wirkungskonzentration des MP an den Gliazellen und Neuronen kann es zu einer Verbesserung der nekrotischen Zellveränderungen kommen. Es zeigt sich nur, dass ein neuroprotektiver Effekt der Steroide möglich ist, aber entscheidend von der Applikationsform abhängig ist.

Der Mechanismus einer neuroprotektiven Wirkung durch MP bleibt aber weiter nicht geklärt. Die Steroidwirkung im Hippocampus scheint besonders durch eine Interaktion mit spezifischen Rezeptoren bedingt zu sein. In experimentellen Studien von Pfaff et al. zeigte sich eine hohe Dichte von Steroidrezeptoren im Bereich des CA 1 und Gyrus dentatus^{227;233}. Dieses könnte auch die Ursache sein für eine lokal unterschiedliche und dosisabhängige Wirkung einer peripheren Steroidgabe sein. Bei einer hohen Dosis von Steroiden konnte festgestellt werden, dass es im Hippocampus zu einer Reduktion der Nervenzellpotentiale kommt. Dieses konnten durch die Veränderungen des Membranpotentials nachgewiesen werden²³³.

Hall et al. vermuteten eine protektive Wirkung im Zusammenhang mit posttraumatischer Neuronendegeneration durch einen antioxidativen Effekt des MP's^{234;235}. Einige Studien zeigten eine deutliche Hemmung der Expression der Adhäsionsmoleküle, inflammatorischer Cytokine und eine Induktion antiinflammatorischer Cytokine wie IL-10 durch Steroide auch nach KSTH^{53;54;236}. Eine inflammatorisch bedingte Schädigung wird zwar auch im Zusammenhang mit KSTH vermutet, scheint jedoch eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Eine inflammatorischen Reaktionen der Mikroglia im Gehirn konnte im Gegensatz zu Ischämie modellen ohne tiefe Hypothermie in unserem Modell nicht nachgewiesen werden. Die Hypothermie scheint eine reaktive Aktivierung der Mikroglia und somit auch eine Reaktion auf einen

inflammatorischen Stimulus zu verhindern, wobei dieser Effekt der Hypothermie sich auch in Zellkulturen bestätigte ²³⁷. Allerdings waren als immunologische Parameter für das neugeborene Schwein nur TNF-alpha und IL-8 verfügbar. Eine inflammatorisch begründete Neuronenschädigung scheint wohl eher nach Trauma und warmer fokaler oder globaler Ischämie eine Rolle zu spielen, wie sich u.a. in den Studien nach Rückenmarkstrauma zeigte ^{165;238}.

Eine weitere Studie fand aber auch einen zellulären Mechanismus für eine exzitatorisch vermittelte nekrotische Nervenzellschädigung durch Steroide heraus, wobei eine Dexamethason-Behandlung zu einer Unterdrückung des inhibitorischen serotonergen Systems mit gleichzeitiger Aktivierung des exzitatorischen dopaminergen Systems führt, woraus eine nekrotische Zellschädigung resultierte ¹⁶⁷. Ob in unserer Untersuchung ebenfalls ein direkter Effekt der Steroide auf das komplexe System der Neurotransmitter des ZNS als Erklärung für eine durch Steroide induzierte Nervenzellschädigung in Frage kommt, bleibt unklar, da eine Untersuchung dieser Veränderungen nicht durchgeführt worden ist.

Ein wesentlicher Unterschied der neuroprotektiven Wirkung des MP bei systemischer und intrathekalen Applikation scheint mit der direkten Wirkung und einer ausreichenden Konzentration auf zerebraler Ebene zusammenzuhängen, wobei die Wirkkonzentration von der Permeation der Steroide in das ZNS abhängig zu sein scheint.

5.4.7 Neuronale Apoptose nach Steroidbehandlung

Bei den mit Methylprednisolon behandelten Tieren wurde eine Zunahme der apoptotischen Veränderungen gefunden, mit Begrenzung auf den Bereich des Gyrus dentatus und des Sektor CA 4. Nur vereinzelt kam es zu apoptotischen Veränderungen in anderen Bereichen wie Kortex oder Kleinhirn. Das Auftreten von Apoptose bei Gabe von MP wurde in einigen wenigen Studien unter anderem in Lymphozyten nachgewiesen ^{239;240 241;242}. Wenige Studien zeigten aber bisher vor allem auch den Zusammenhang zwischen einer Hyperglykämie und einer Induktion von Apoptose der Neuronen des zentralen Nervensystems ^{113;191;220}.

Die Zunahme apoptotischer Veränderungen in dieser Untersuchung könnte mit der beobachteten Hyperglykämie im Rahmen der Steroidintervention zusammenhängen. Der genaue Mechanismus der Entstehung von Apoptose nach Steroidapplikation ist unbekannt, es können aber vor allem regionale Unterschiede in der Verteilung der Steroidrezeptoren angeführt werden, woraus eine regional unterschiedlich starke Steroidwirkung resultiert ¹⁶⁴. Der Hippocampus verfügt gegenüber anderen Hirnregionen über eine außergewöhnlich hohe Dichte der Steroidrezeptoren ^{164;226;227}. Es konnten bisher zwei Steroidrezeptoren nachgewiesen werden, wobei die Verteilung dieser beiden Rezeptoren unterschiedlich ist, jedoch beide Formen im Hippocampus vorkommen ¹⁴³. Das Vorkommen der Steroidrezeptoren in den Mitochondrien der Nervenzellen lässt auf eine direkte Beeinflussung der mitochondrialen Atmungskette und somit der zellulären Energiegewinnung schließen ¹⁴⁵.

Bei intrathekalen Gabe des Methylprednisolon zeigte sich in experimentellen Studien, dass ein Teil der im Liquor enthaltenen Steroide in die weiße Substanz übergehen²⁰⁶. Einen direkten Effekt der Steroide auf die Entstehung der Apoptose konnte Almeida et al. erstmals beschreiben¹⁵⁰. Wenn man davon ausgeht, dass die Konzentration nach intrathekalen Gabe im Gehirn höher ist, als bei systemischer Gabe, dann müsste die Apoptose in der intrathekalen Gruppe auch deutlich höher ausfallen²⁰⁵.

Das Auftreten regionaler Apoptose im Gyrus dentatus scheint somit eher durch die systemische als durch die intrathekale Gabe von MP bedingt zu sein. Die Hyperglykämie war in der systemischen Gruppe signifikant höher, sowohl unmittelbar nach Kreislaufstillstand, als auch in der postoperativen Phase. Es ist daher anzunehmen, dass die Hyperglykämie bei der Entstehung einer regionalen Vermehrung apoptotischer Neuronenveränderungen auch nach kalter Ischämie eine relevante Rolle spielt^{113;220}.

Veränderungen des Calciumhaushaltes der Astrozyten oder Neuronen nach Ischämie können zur Entstehung exzitatorischer Transmitter oder freier Radikale und zur Aktivierung intrazellulärer Enzyme wie Caspase, Lipase, Protease führen, welches dann eine neuronale Apoptose mit Fragmentation der DNA zur Folge hat^{60;114;189}. Die signifikant niedrigeren Calciumwerte der intrathekalen Gruppe könnten somit ein wesentlicher Bestandteil einer neuroprotektiven Wirkung durch die Steroide sein.

Trotzdem stellen die apoptotischen Neuronenveränderungen eine wesentliche Nebenwirkung der Methylprednisolongabe im neugeborenem Alter und nach CPB und KSTH dar und sie können die pathophysiologische Grundlage sein, für die zerebralen Komplikationen nach Steroidgabe im Neugeborenenalter¹⁴⁰.

5.5 Molekulargenetische Untersuchungen

Die Bestimmung der Genexpression von den pro-apoptotischen Proteinen Bak und FAS, sowie für das anti-apoptotische Protein Bcl-xl, erfolgte im frontalen Kortex. Zusätzlich wurde die Genexpression für das Hitze-Schock-Protein 70 (HSP 70) ermittelt.

Bei den Proteinen, die an der Entstehung der Apoptose beteiligt sind, unterscheidet man eine intrazelluläre (z.B. Bak) oder extrazelluläre (z.B. FAS) Lokalisation. Durch den Einfluss der hypothermen Ischämie im Rahmen des KSTH zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression für das intrazellulär lokalisierte Protein Bak. Die Expression von FAS war nach 120 min KSTH (i.e. Kontrollgruppe) im Vergleich zu den Tieren ohne KSTH jedoch nicht signifikant verändert.

5.5.1 Genexpression des Hitze-Schock-Proteins 70 kDa (HSP 70)

Hitze-Schock-Proteine (HSP) sind molekulare Chaperonen und werden normalerweise kontinuierlich synthetisiert von den glialen, vaskulären und neuronalen Zellen. Zusätzlich führen eine Reihe von Stressoren des ZNS zu einer Synthesesteigerung dieser Proteine. Den verschiedenen HSP's werden unterschiedliche

Funktionen zugeschrieben, u.a. auch Funktionen der interzellulären Kommunikation und Funktionen im Zusammenhang mit der Zellwanderung und dem Zelluntergang durch Apoptose.

Eine verstärkte Expression des HSP 70 wird jedoch in der Literatur vielfach im Sinne einer Zellprotektion betrachtet. Dabei hemmt das HSP 70 auf der einen Seite die Entstehung der Apoptose durch Interaktion mit dem Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor 1 (APAF-1) und verhindert dabei die typische Chromatinkondensation durch den Apoptose-Induktionsfaktor ²⁴³. Der zelluläre Ursprung des HSP 70 ist bisher nicht ausreichend geklärt. Es wird vermutet, dass die Neuronen und die Gliazellen das HSP 70 nach entsprechendem Stimulus synthetisieren, und dass das Protein die Gliazellen und auch die Neuronen durch Exozytose verläßt, wie in der Zellkultur nach thermischem Stress beobachtet werden konnte ²⁴⁴. Foster et al. konnte das HSP 70 in den neuronalen Fortsätzen (Dendriten) nachweisen ²⁴⁵. Einige Studien, wie die von Liu et al. beschrieben nach zerebraler Ischämie eine Detektion des HSP 70 in den Pyramidenzellen des Hippocampus mittels Immunhistochemie ²⁴⁶. Zugleich wiesen sie durch die Bestimmung der spezifischen m-RNA eine frühe und eine späte Steigerung der Proteinsynthese des HSP 70 nach ²⁴⁶. Die frühe vermehrte Expression des HSP zeigte einen signifikant protektiveren Effekt für die Neuronen im Hippocampus ²⁴⁷. Eine Studie von Reshef et al. zeigte, dass die HSP 70 in den Neuronen durch Interaktion mit Kaliumkanälen und deren Öffnung zu einer Zellprotektion der Neuronen gegen Ischämie und Reperfusionsschaden führt. Wobei die neuronale sich deutlich von der kardialen Expression unterschied ²⁴⁸. In einer in-vitro Studie von Sato et al. an Hippocampus-Neuronen konnte bei vorhergehender Hyperthermie eine deutliche Reduzierung des durch Glutamat-Toxizität hervorgerufenen neuronalen Schadens an den CA1 Neuronen festgestellt werden ¹⁸⁷. Dabei korrelierte die Induktion des HSP 70 mit einer morphologisch sichtbaren Zellprotektion der Hippocampus-Neurone in CA 1 und CA 4 ¹⁸⁷.

Ein signifikanter Anstieg der Expression des HSP 70 konnte nur in der intrathekalen MP-Gruppe festgestellt werden. Dabei war die Expression sowohl gegenüber der Kontrollgruppe, als auch gegenüber der systemischen Steroidgruppe signifikant erhöht. Bei gleichzeitig morphologisch sichtbarer neuronaler Protektion durch die intrathekale Steroidbehandlung kann die erhöhte Expression von HSP 70 als prädiktiver Faktor für eine neuronale Zellprotektion angesehen werden. Es kann vermutet werden, dass bei einer erhöhten Expression des HSP 70 es zu weniger neuronaler Nekrose kommt, wie es schon von Sato et al. beobachtet werden konnte ¹⁸⁷.

5.5.2 Expression apoptotischer Gene (Bak, FAS, Bcl-x_L)

Für die Entstehung der Apoptose bedarf es einer aktiven Genexpression und u.a. der Aktivierung einer zytoplasmatischen Caspase-Kaskade. Diese Kaskade kann durch eine Reihe von Faktoren und Transmittern aus Mitochondrien, dem Zytoplasma und durch intrazelluläre oder extrazelluläre Proteine beeinflusst werden. Auch eine Auto-Aktivierung ist möglich ²⁴⁹. Für die intrazelluläre Aktivierung spielen vor allem zytoplasmatische Proteine wie z.B. Bak und Mediatoren der Mitochondrien, wie der sogenannte Apoptose-Induktions-Faktor (AIF) und Cytochrom C eine Rolle. Diese interagieren mit einem zytosolischen

Komplex, dem sogenannte Apoptosome, welcher zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade führt und die Zelle die einzelnen Stadien des programmierten Zelltodes durchlaufen kann. Das intrazellulär vorkommende pro-apoptotische Protein Bak kann zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade führen ²⁵⁰.

Als extrazelluläre Stimuli können verschiedenen Mediatoren über einen trimeren Rezeptor an der Zellmembran mit einem zytoplasmatischen Teil, dem „death inducing signaling Komplex“ (DISK), die Caspase-Kaskade aktivieren. Extrazelluläre Mediatoren sind dabei die löslichen Proteine FAS (FAS-L, Apo-1L), TNF- α und andere Cytokine. Diese Proteine binden an die spezifischen Rezeptoren (CD95=FAS-R, TNF-R1) der Zellmembran, welcher dann eine Modulation des sich an der Innenseite der Zellmembran befindlichen „death inducing signaling Komplex“ (DISK) bewirkt ²⁵¹. Durch diese Konformationsänderungen werden Mechanismen aktiviert, die letzten Endes zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade führen ²⁵¹. Die vermehrte Expression extrazellulären pro-apoptotischen Proteins FAS kann somit eine Induktion des programmierten Zelltodes bewirken ²⁵².

Aber es gibt auch Proteine, die hemmend auf die Entstehung der Apoptose wirken. Hierzu gehört Bcl-x_L, aus Bcl-2-Familie. Bcl-x_L ist in den Mitochondrien lokalisiert und eine erhöhte Expression kann Entstehung des programmierten Zelltodes hemmen ^{196;253;59}. Die vermehrte Expression des Bcl-x_L Proteins nach Ischämie oder Hypoxie wurde in einigen Studien im Sinne einer Neuroprotektion gewertet, da sowohl neuronale Apoptose als auch Nekrose reduziert waren ²⁵⁴.

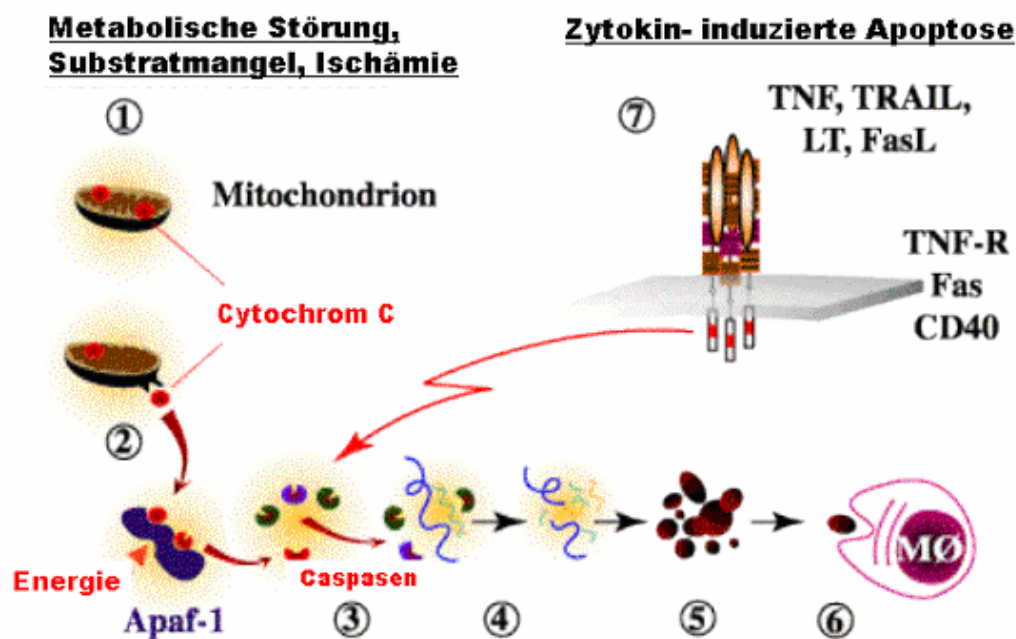


Abbildung 5-3: Zelluläre Steuerung der Apoptose

Dargestellt ist das komplexe Zusammenspiel zwischen zytoplasmatischen und mitochondriale Segmenten bei dem apoptotischen Zelltod. Ein zentraler Mechanismus dabei ist die Freisetzung des Cytochrom C aus den Mitochondrien und dessen Interaktion mit dem Apoptose aktivierendem Komplex und der Caspase-Kaskade. Externe Stimuli wie TNF, FAS-Liganden und Zytokine führen alternativ zur Aktivierung der Caspase-Kaskade und induzieren die Apoptose.

Die Expression der Apoptose-Gene Bak und FAS waren nach KSTH erhöht (siehe Abb. 4-32). Nur die Expression des intrazellulären Bak schien aber durch KSTH signifikant erhöht zu sein ($p=0.01$). Die systemische und intrathekale Steroidbehandlung führte zu einer zusätzlichen Zunahme der Expression dieser pro-apoptotischen Gene ($p=0.01$).

Die Expression des anti-apoptotischen Bcl- x_L Genes war in beiden Steroidgruppen erhöht, wobei nur der Unterschied in der intrathekalen Gruppe signifikant war ($p=0.03$). Für die Entstehung von Apoptose ist jedoch vor allem das Verhältnis von pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. Bak und FAS zu den anti-apoptotischen wie z.B. Bcl- x_L entscheidend¹⁹⁶. Betrachtet man dieses Verhältnis in den Versuchsgruppen, so zeigte sich nach systemischer Steroidbehandlung bei nur geringer Zunahme der Expression des anti-apoptotischen Genes Bcl- x_L eine deutliche Zunahme der Expression der pro-apoptotischen Gene Bak und FAS. Das Verhältnis ändert sich damit zugunsten der pro-apoptotischen Gene in den systemisch behandelten Tiere. In der intrathekalen Gruppe zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der pro-apoptotischen Gene und aber auch eine signifikante Zunahme der anti-apoptotischen Gene. Diese Ergebnisse korrelierten mit der Morphologie und dem vermehrten Auftreten von neuronaler Apoptose.

Man kann postulieren, dass eine Steroidbehandlung im Zusammenhang mit verlängertem KSTH zu einer Zunahme der pro-apoptotischen Proteine im Gehirn führt, was sich auch morphologisch beweisen läßt.

Da die Analyse bisher nur im frontalen Kortex durchgeführt wurde, ist es möglich, dass in den anderen Hirnregionen wie z.B. im Hippocampus noch deutlichere Unterschiede der Genexpression erfasst werden können.

5.6 Zusammenfassung der Veränderungen durch die Steroidbehandlung

Mit einer systemischen Steroidbehandlung lässt sich im Zusammenhang mit KSTH kein neuroprotektiver Effekt erzielen. Dieses ließ sich aus der Tatsache schließen, dass in der systemischen Steroidgruppe eine Zunahme der ischämischen Schädigung nach KSTH und eine Induktion neuronaler Apoptose beobachtet werden konnte. Ein Ausbleiben einer neuroprotektiven Wirkung ließ sich durch unterschiedliche Messungen dokumentieren, wobei es in der systemischen MP-Gruppe zu erhöhten postoperativen Werten für Calcium kam. Die morphologische Auswertung ergab ein signifikant höheres Ausmaß neuronaler Zellschädigung im Sinne neuronaler Nekrose und Apoptose. Die molekulargenetischen Untersuchungen zeigten die signifikante Zunahme pro-apoptotischer Proteine (Bak und FAS) bei nur geringer Zunahme des anti-apoptotischen Proteins Bcl- x_L . Somit war das Verhältnis zugunsten der pro-apoptotischen Proteine verschoben. Eine Induktion „protektiver“ Proteine wie z.B. des HSP 70 blieb aus.

Die intrathekale Behandlung mit MP zeigte einen signifikanten neuroprotektiven Effekt mit Reduktion der neuronalen Nekrose und signifikanten Verbesserung des Schädigungsmusters nach KSTH. Zusätzlich blieben im Vergleich zu der systemischen Gruppe eine Hyperglykämie und Hyperkalzämie in dieser Gruppe aus. Intrathekales MP führt zu einer signifikanten Erhöhung der Expression des protektiven Hit-

ze-Schock-Proteins (HSP 70). Auch bei intrathekaler Steroidbehandlung blieb eine Induktion neuronaler Apoptose nicht aus, sie war jedoch moderater als bei systemischer Behandlung. Apoptose scheint eine wesentliche Nebenwirkung der Steroidapplikation zu sein. Auf molekulargenetischer Ebene zeigte sich bei intrathekale MP-Gabe eine geringere Erhöhung der Expression für die pro-apoptischen Proteine Bak und FAS, bei gleichzeitiger gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhter Expression für das anti-apoptische Proteine Bcl-x_L. Im klinischen Einsatz wird eine intrathekale Behandlung vor kardiochirurgischen Operationen jedoch schwierig zu realisieren sein.

5.7 Limitationen

Eine wesentliche Limitation dieser durchgeführten experimentellen Studie ist die postoperative Überlebenszeit und das damit kurze Zeitfenster der morphologischen Analyse. Jedoch zeigte sich in der Studie von Kurth et al., der die Tiere mit unterschiedlich langer Überlebenszeit verglich, ein Maximum der morphologischen Veränderungen nach 6-12 Stunden⁸⁸. Zusätzlich konnte bisher noch keine Aussage über die Konzentration des Methylprednisolon's im Gehirn gemacht werden. Ob neben der Vorbehandlung eine weitere Gabe nach Kreislaufstillstand das neuronale Schädigungsmuster hätte positiv beeinflussen können, oder ob das Ausmaß der Schädigung noch mehr zugenommen hätte, bleibt fraglich.

Weitere regionale molekulargenetische Untersuchungen an dem gefrorenem Hirnmaterial zur Evaluierung der neuronalen Apoptose werden folgen. Auch die immunhistochemische Anfärbung von HSP 70 zeigte bisher erste vielversprechende Ergebnisse. Die Steroidwirkung im Rahmen zerebraler Ischämie und Hypothermie wird auch Gegenstand weiterer Forschung sein. Obwohl mit der intrathekalen Vorbehandlung eine neuronale Protektion erzielt werden konnte, bleibt ihr klinischer Ansatz fraglich und technisch kompliziert. Eine weiterführende Evaluation des spezifischen Effektes der Steroide und der Hypothermie in Zellkulturen ist bereits angelaufen. Ebenso werden weitere Analyse bezüglich des Steroideffektes, sowie zur Entstehung apoptotischer Veränderungen durch Steroide an dem verbliebenden Hirnmaterial folgen. Diese Ergebnisse werden zusätzlich Gegenstand klinischer Forschung sein.

Abstract

Einleitung: Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (KSTH) wird in der Herzchirurgie zur Korrektur komplexer angeborener Herzfehler angewendet. In den letzten Jahren zeigte sich eine Abnahme der Morbidität und Mortalität nach kardiochirurgischen Eingriffen. Es entstanden aber gleichzeitig Bedenken über eine Beeinträchtigung der neurologischen Funktion und psychomotorischen Entwicklung der operierten Kinder. Wir untersuchten das morphologische Schädigungsmuster im Gehirn nach extrakorporaler Zirkulation mit Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie (KSTH) in einem neonatalen Tiermodell. Zusätzlich evaluierten wir morphologisch den Einfluss einer neuroprotektiven Vorbehandlung mit systemischer und intrathekaler Applikation von Methylprednisolon (MP).

Material und Methoden: 24 neugeborenen Ferkeln mit einem Alter unter 1 Woche (Gewicht: $2,1 \pm 0,5$ kg KG) wurden mittels eines cardiopulmonalen Bypass (CPB) bei 15 °C rektaler Körpertemperatur einem totalen Kreislaufstillstand (KSTH) von 120 Minuten ausgesetzt. Nach Reperfusion wurden die Tiere vom CPB entwöhnt und für 6 Std. überwacht. Eine Gruppe ohne Intervention mit 12 Tieren diente als Kontrollgruppe, bei 7 Tieren wurde eine systemische und bei 5 Tieren eine intrathekale Methylprednisolongabe (Urbason) präoperativ durchgeführt. Das Gehirn wurde nach Fixierung regional histologisch und immunhistochemisch untersucht. Die nekrotischen und apoptotischen Neurone wurden quantitativ in Hippocampus, Kortex, Stammganglien und Kleinhirn erfasst. Molekulargenetische Untersuchungen erfolgten im frontalen Kortex und es wurde die Genexpression mittels „Real-time PCR“ für das Hitzeschock-Protein 70 kD (HSP 70) und die apoptotischen Gene Bak, FAS und Bcl-x_L erfasst.

Ergebnisse: Das Schädigungsmuster nach KSTH von 120 Minuten bestand aus Nekrose der Neuronen mit einem Fokus in Hippocampus, Kleinhirn und Kortex. Zusätzlich kam es im Gyrus dentatus zum Auftreten apoptotischer Neuronenveränderungen, wobei durch die MP-Vorbehandlung die Anzahl apoptotischer Neurone zunahm. Unter der systemischen Steroidbehandlung kam es zu einer signifikanten Hyperglykämie. Molekulargenetisch zeigten sich bei systemischer Steroidvorbehandlung eine Induktion proapoptotischer Gene. Nach intrathekaler Steroidgabe war das Verhältniss zugunsten der anti-apoptotischen Gene signifikant verändert. Die Expression des HSP-70 war nur in der intrathekalen Gruppe signifikant erhöht und scheint im Zusammenhang mit einer geringeren neuronalen Zellschädigung zu stehen.

Schlussfolgerung: Eine systemische Vorbehandlung mit MP zeigte keinen neuroprotektiven Effekt, im Gegenteil kam es zu einer Zunahme nekrotischer und apoptotischer neuronaler Zellveränderungen. Bei intrathekaler Applikation des MP mit Umgehung der Blut-Hirn-Schranke kam es zu einer signifikanten Reduktion der nekrotischen Zellveränderungen im Sinne einer neuroprotektiven Wirkung. Auch hier zeigte sich aber eine Zunahme neuronaler Apoptose. Die routinemäßige systemische Applikation von Steroiden in der Kinderherzchirurgie sollte aufgrund der o.g. Ergebnisse kritisch überdacht werden.

Schlagwörter: Apoptose, Cardiopulmonaler Bypass, Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie, Methylprednisolon, Nekrose, Neuroprotektion, neugeborene Ferkel, Steroidbehandlung

Literatur

1. Ferry PC. Neurologic sequelae of open-heart surgery in children. An 'irritating question'. *Am J Dis Child*. 1990;144:369-73.
2. Wong BI, McLean RF, Naylor CD, Snow WG, Harrington EM, Gawel MJ, Woods RB, Fremes SE. Central-nervous-system dysfunction after warm or hypothermic cardiopulmonary bypass. *Lancet*. 1992;339:1383-4.
3. du Plessis AJ, Kramer U, Jonas RA, Wessel DL, Riviello JJ. West syndrome following deep hypothermic infant cardiac surgery. *Pediatr Neurol*. 1994;11:246-51.
4. Fallon P, Aparicio JM, Elliott MJ, Kirkham FJ. Incidence of neurological complications of surgery for congenital heart disease. *Arch Dis Child*. 1995;72:418-22.
5. Rappaport LA, Wypij D, Bellinger DC, Helmers SL, Holmes GL, Barnes PD, Wernovsky G, Kuban KC, Jonas RA, Newburger JW. Relation of seizures after cardiac surgery in early infancy to neurodevelopmental outcome. Boston Circulatory Arrest Study Group. *Circulation*. 1998;97:773-9.
6. Pua HL, Bissonnette B. Cerebral physiology in paediatric cardiopulmonary bypass. *Can J Anaesth*. 1998;45:960-78.
7. Undar A, Masai T, Yang SQ, Goddard-Finegold J, Frazier OH, Fraser CD, Jr. Effects of perfusion mode on regional and global organ blood flow in a neonatal piglet model. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:1336-42; discussion 1342-3.
8. Bellinger DC, Wernovsky G, Rappaport LA, Mayer JE, Jr., Castaneda AR, Farrell DM, Wessel DL, Lang P, Hickey PR, Jonas RA, et al. Cognitive development of children following early repair of transposition of the great arteries using deep hypothermic circulatory arrest. *Pediatrics*. 1991;87:701-7.
9. Newburger JW, Jonas RA, Wernovsky G, Wypij D, Hickey PR, Kuban KC, Farrell DM, Holmes GL, Helmers SL, Constantinou J, et al. A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery [see comments]. *N Engl J Med*. 1993;329:1057-64.
10. Bellinger DC, Jonas RA, Rappaport LA, Wypij D, Wernovsky G, Kuban KC, Barnes PD, Holmes GL, Hickey PR, Strand RD, et al. Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass [see comments]. *N Engl J Med*. 1995;332:549-55.
11. Wernovsky G, Wypij D, Jonas RA, Mayer JE, Jr., Hanley FL, Hickey PR, Walsh AZ, Chang AC, Castaneda AR, Newburger JW, et al. Postoperative course and hemodynamic profile after the arterial switch operation in neonates and infants. A comparison of low-flow cardiopulmonary bypass and circulatory arrest. *Circulation*. 1995;92:2226-35.
12. Kern JH, Hinton VJ, Nereo NE, Hayes CJ, Gersony WM. Early developmental outcome after the Norwood procedure for hypoplastic left heart syndrome. *Pediatrics*. 1998;102:1148-52.
13. du Plessis AJ. Cerebral hemodynamics and metabolism during infant cardiac surgery. Mechanisms of injury and strategies for protection. *J Child Neurol*. 1997;12:285-300.
14. du Plessis AJ. Mechanisms of brain injury during infant cardiac surgery. *Semin Pediatr Neurol*. 1999;6:32-47.
15. du Plessis AJ, Johnston MV. The pursuit of effective neuroprotection during infant cardiac surgery. *Semin Pediatr Neurol*. 1999;6:55-63.
16. Mezrow CK, Midulla PS, Sadeghi AM, Gandsas A, Wang W, Bodian C, Shing HH, Zappulla R, Dapunt OE, Griep RB. Quantitative electroencephalography: a method to assess cerebral injury after hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;109:925-34.

17. Abdul-Khaliq H, Schubert S, Stoltenburg-Didinger G, Troitzsch D, Bottcher W, Hubler M, Meissler M, Grosse-Siestrop C, Alexi-Meskishvili V, Hetzer R, Lange PE. Protein S-100beta in brain and serum after deep hypothermic circulatory arrest in rabbits: relationship to perivascular astrocytic swelling. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38:1169-72.
18. Kirshbom PM, Skaryak LA, DiBernardo LR, Kern FH, Greeley WJ, Gaynor JW, Ungerleider RM. Effects of aortopulmonary collaterals on cerebral cooling and cerebral metabolic recovery after circulatory arrest. *Circulation*. 1995;92:II490-4.
19. Raskin SA, Fuselier VW, Reeves-Viets JL, Coselli JS. Deep hypothermic circulatory arrest with and without retrograde cerebral perfusion. *Int Anesthesiol Clin*. 1996;34:177-93.
20. Langley SM, Chai PJ, Jaggars JJ, Ungerleider RM. Preoperative high dose methylprednisolone attenuates the cerebral response to deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000;17:279-86.
21. Kurth CD, Priestley M, Watzman HM, McCann J, Golden J. Desflurane confers neurologic protection for deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs. *Anesthesiology*. 2001;95:959-64.
22. Shum-Tim D, Tchervenkov CI, Jamal AM, Nimeh T, Luo CY, Chedrawy E, Laliberte E, Philip A, Rose CP, Lavoie J. Systemic steroid pretreatment improves cerebral protection after circulatory arrest. *Ann Thorac Surg*. 2001;72:1465-71; discussion 1471-2.
23. Crafoord C. Operationen am offenen Herzen mit Herz-Lungen-Maschine (Stockholmer Modell). In: *Langenbecks Archiv für klinische Chirurgie*; 1958:257-266.
24. Gibbon J. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minnesota Med*. 1954;37:171.
25. Björg VO. An artificial heart or cardiopulmonary machine. Performance in animals. *Lancet*. 1948;260.
26. Dennis C, Springs Jr. DS, Nelson GE, Karlson KE, Nelson RM, Thomas JV, Eder WP, Varco RL. Development of pump-oxygenator to replace the heart and lungs;an apparatus applicable to human patients and application in one case. *Annals of Surgery*. 1951;134:709-721.
27. Lewis FJ, Taufic M. Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one succesful case. *Surgery*. 1953;33.
28. De Wall RA, Warden HE, Gott VL, Read RC, Varco RL, Lillehei CW. Total body perfusion for open cardiomyotomy utilizing the bubble oxygenator. Physiologic responses in man. *Journal of Thoracic Surgery*. 1956;32:591-603.
29. Kirklin JW. Intracardiac surgery with the aid of a mechanical pump-oxygenator system (Gibbon-type): Report of eight cases. *Proc Mayo Clin*. 1955;30:201 - 206.
30. Sealy WC, Brown IW, Young WG. A report on the use of both extracorporeal circulation and hypothermia for open heart surgery. *Ann Surg*. 1958;147:603 - 613.
31. Drew CE, Keen G, Benazon DB. Profound hypothermia. *Lancet*. 1959;1:745 - 747.
32. Ferry PC. Neurologic sequelae of cardiac surgery in children. *Am J Dis Child*. 1987;141:309-12.
33. Kirkham FJ. Recognition and prevention of neurological complications in pediatric cardiac surgery. *Pediatr Cardiol*. 1998;19:331-45.
34. Tuxen DV, Scheinkestel CD, Salamonson R. Air embolism--a neglected cause of stroke complicating cardiopulmonary bypass (CPB) surgery [letter; comment]. *Aust N Z J Med*. 1994;24:732-3.
35. Slogoff S, Girgis KZ, Keats AS. Etiologic factors in neuropsychiatric complications associated with cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 1982;61:903-11.
36. Padayachee TS, Parsons S, Theobald R, Linley J, Gosling RG, Deverall PB. The detection of microemboli in the middle cerebral artery during cardiopulmonary bypass: a transcranial Doppler ultrasound investigation using membrane and bubble oxygenators. *Ann Thorac Surg*. 1987;44:298-302.

37. Padayachee TS, Parsons S, Theobald R, Gosling RG, Deverall PB. The effect of arterial filtration on reduction of gaseous microemboli in the middle cerebral artery during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 1988;45:647-9.
38. Pugsley W, Klinger L, Paschalis C, Treasure T, Harrison M, Newman S. The impact of microemboli during cardiopulmonary bypass on neuropsychological functioning. *Stroke.* 1994;25:1393-9.
39. Madsen PL, Holm S, Herning M, Lassen NA. Average blood flow and oxygen uptake in the human brain during resting wakefulness: a critical appraisal of the Kety-Schmidt technique. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13:646-55.
40. Henriksen L. Evidence suggestive of diffuse brain damage following cardiac operations. *Lancet.* 1984;1:816-20.
41. Kurth CD, O'Rourke MM, O'Hara IB. Comparison of pH-stat and alpha-stat cardiopulmonary bypass on cerebral oxygenation and blood flow in relation to hypothermic circulatory arrest in piglets [see comments]. *Anesthesiology.* 1998;89:110-8.
42. Tomiyama Y, Jansen K, Brian JE, Jr., Todd MM. Hemodilution, cerebral O₂ delivery, and cerebral blood flow: a study using hyperbaric oxygenation. *Am J Physiol.* 1999;276:H1190-6.
43. Settergren G, Ohqvist G, Lundberg S, Henze A, Bjork VO, Persson B. Cerebral blood flow and cerebral metabolism in children following cardiac surgery with deep hypothermia and circulatory arrest. Clinical course and follow-up of psychomotor development. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982;16:209-15.
44. Mezrow CK, Sadeghi AM, Gandsas A, Shiang HH, Levy D, Green R, Holzman IR, Griep RB. Cerebral blood flow and metabolism in hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1992;54:609-15; discussion 615-6.
45. Mezrow CK, Sadeghi AM, Gandsas A, Dapunt OE, Shiang HH, Zappulla RA, Griep RB. Cerebral effects of low-flow cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1994;57:532-9; discussion 539.
46. Hoffman WE, Charbel FT, Edelman G, Ausman JI. Brain tissue oxygen pressure, carbon dioxide pressure, and pH during hypothermic circulatory arrest. *Surg Neurol.* 1996;46:75-9.
47. Burrows FA, Bissonnette B. Cerebral blood flow velocity patterns during cardiac surgery utilizing profound hypothermia with low-flow cardiopulmonary bypass or circulatory arrest in neonates and infants. *Can J Anaesth.* 1993;40:298-307.
48. Ashraf S, Bhattacharya K, Tian Y, Watterson K. Cytokine and S100B levels in paediatric patients undergoing corrective cardiac surgery with or without total circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999;16:32-7.
49. Aoki M, Jonas RA, Nomura F, Kawata H, Hickey PR. Anti-CD18 attenuates deleterious effects of cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest in piglets. *J Card Surg.* 1995;10:407-17.
50. Nagashima M, Shin'oka T, Nollert G, Shum-Tim D, Rader CM, Mayer JE, Jr. High-volume continuous hemofiltration during cardiopulmonary bypass attenuates pulmonary dysfunction in neonatal lambs after deep hypothermic circulatory arrest. *Circulation.* 1998;98:II378-84.
51. Volk T, Schmutzler M, Engelhardt L, Docke WD, Volk HD, Konertz W, Kox WJ. Influence of aminosteroid and glucocorticoid treatment on inflammation and immune function during cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med.* 2001;29:2137-42.
52. Moore FD, Jr., Warner KG, Assousa S, Valeri CR, Khuri SF. The effects of complement activation during cardiopulmonary bypass. Attenuation by hypothermia, heparin, and hemodilution. *Ann Surg.* 1988;208:95-103.
53. Schurr UP, Zund G, Hoerstrup SP, Grunenfelder J, Maly FE, Vogt PR, Turina MI. Preoperative administration of steroids: influence on adhesion molecules and cytokines after cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2001;72:1316-20.

54. Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D, Marecaux G, Shahla M, Barvais L, Leclerc JL, Vincent JL. Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery*. 1996;119:76-80.
55. Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, Barvais L, Huynh CH, Deviere J, DeSmet JM, Vincent JL. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *Am Heart J*. 1997;133:335-9.
56. Corbi PJ, Rahmati M, Lecron JC. Inflammatory response associated with cardiopulmonary bypass and effect of methylprednisolone. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122:1052-3.
57. Ginsberg MD, Sternau LL, Globus MY, Dietrich WD, Busto R. Therapeutic modulation of brain temperature: relevance to ischemic brain injury. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1992;4:189-225.
58. Tseng EE, Brock MV, Kwon CC, Annanata M, Lange MS, Troncoso JC, Johnston MV, Baumgartner WA. Increased intracerebral excitatory amino acids and nitric oxide after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg*. 1999;67:371-6.
59. Mc Conkey D. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett*. 1998;99:157-168.
60. Lipton SA, Nicotera P. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium*. 1998;23:165-71.
61. Stepanichev M, Onufriev MV, Lazareva NA, Zarzhetskii Iu V, Mutuskina EA, Guvich AM, Gulliaeva NV. The effect of systemic circulatory arrest on the process of free-radical oxidation and on NO-synthase activity in the brain structures of rats of different behavioral types in an emotional resonance test: the acute effects]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*. 1998;48:541-50.
62. Ren Z, Ding W, Su Z, Gu X, Huang H, Liu J, Yan Q, Zhang W, Yu X. Mechanisms of brain injury with deep hypothermic circulatory arrest and protective effects of coenzyme Q10. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994;108:126-33.
63. Ostrowski RP, Piotrowski P, Pankowska T, Smialek M. Evaluation of morphological changes after treatment with coenzyme Q10 (CoQ10) in endothelin-1 induced experimental ischemia in the rat. *Folia Neuropathol*. 1998;36:185-8.
64. Greeley WJ, Kern FH, Ungerleider RM, Boyd Jld, Quill T, Smith LR, Baldwin B, Reves JG. The effect of hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral metabolism in neonates, infants, and children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1991;101:783-94.
65. Muijsce DJ, Towfighi J, Heitjan DF, Vannucci RC. Differences in intranscemic temperature influence neurological outcome after deep hypothermic circulatory arrest in newborn dogs. *Stroke*. 1994;25:1433-41; discussion 1442.
66. McCullough JN, Zhang N, Reich DL, Juvonen TS, Klein JJ, Spielvogel D, Ergin MA, Griep RB. Cerebral metabolic suppression during hypothermic circulatory arrest in humans. *Ann Thorac Surg*. 1999;67:1895-9; discussion 1919-21.
67. Sano T, Drummond JC, Patel PM, Grafe MR, Watson JC, Cole DJ. A comparison of the cerebral protective effects of isoflurane and mild hypothermia in a model of incomplete forebrain ischemia in the rat [see comments]. *Anesthesiology*. 1992;76:221-8.
68. Stocker F, Herschkowitz N, Bossi E, Stoller M, Cross TA, Aue WP, Seelig J. Cerebral metabolic studies in situ by ³¹P-nuclear magnetic resonance after hypothermic circulatory arrest. *Pediatr Res*. 1986;20:867-71.
69. Yager JY, Brucklacher RM, Muijsce DJ, Vannucci RC. Cerebral oxidative metabolism during hypothermia and circulatory arrest in newborn dogs. *Pediatr Res*. 1992;32:547-52.
70. Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia on the rate of excitatory amino acid release after ischemic depolarization. *Stroke*. 1996;27:913-8.

71. Sorensen HR, Husum B, Waaben J, Andersen K, Andersen LI, Gefke K, Kaarsen AL, Gjedde A. Brain microvascular function during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987;94:727-32.
72. Burrows FA, Bissonnette B. Cerebral blood flow velocity patterns during cardiac surgery utilizing profound hypothermia with low-flow cardiopulmonary bypass or circulatory arrest in neonates and infants [see comments]. *Can J Anaesth.* 1993;40:298-307.
73. Aoyagi M, Flasterstein AH, Barnette J, Koch LV, Ross JN, Jr., Kennedy JH. Cerebral effects of profound hypothermia (18 degrees C) and circulatory arrest. *Circulation.* 1975;52:152-60.
74. van der Linden J, Astudillo R, Ekroth R, Scallan M, Lincoln C. Cerebral lactate release after circulatory arrest but not after low flow in pediatric heart operations. *Ann Thorac Surg.* 1993;56:1485-9.
75. Azariades M, Firmin RK, Lincoln C, Lennox SC. Cerebral function analysis during deep hypothermia and total circulatory arrest in infant lambs. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1988;36:133-6.
76. Treasure T. The safe duration of total circulatory arrest with profound hypothermia. *Ann R Coll Surg Engl.* 1984;66:235-40.
77. Bokesch PM, Marchand J, Seirafi PA, Deiss JM, Warner KG, Bronson RT, Kream RM. Immediate-early gene expression in ovine brain after cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest. *Anesthesiology.* 1996;85:1439-46.
78. Svenmarker S, Sandstrom E, Karlsson T, Haggmark S, Jansson E, Appelblad M, Lindholm R, Aberg T. Neurological and general outcome in low-risk coronary artery bypass patients using heparin coated circuits. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001;19:47-53.
79. Cook DJ, Orszulak TA, Daly RC. Minimum hematocrit at differing cardiopulmonary bypass temperatures in dogs. *Circulation.* 1998;98:II170-4; discussion II175.
80. Cook DJ, Orszulak TA, Daly RC, MacVeigh I. Minimum hematocrit for normothermic cardiopulmonary bypass in dogs. *Circulation.* 1997;96:II-200-4.
81. Shin'oka T, Shum-Tim D, Jonas RA, Lidov HG, Laussen PC, Miura T, du Plessis A. Higher hematocrit improves cerebral outcome after deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;112:1610-20; discussion 1620-1.
82. O'Rourke MM, Nork KM, Kurth CD. Neonatal cerebral oxygen regulation after hypothermic cardiopulmonary bypass and circulatory arrest. *Crit Care Med.* 2000;28:157-62.
83. Cooper WA, Duarte IG, Thourani VH, Nakamura M, Wang NP, Brown WM, 3rd, Gott JP, Vinten-Johansen J, Guyton RA. Hypothermic circulatory arrest causes multisystem vascular endothelial dysfunction and apoptosis. *Ann Thorac Surg.* 2000;69:696-702; discussion 703.
84. Skaryak LA, Lodge AJ, Kirshbom PM, DiBernardo LR, Wilson BG, Meliones JN, Ungerleider RM, Gaynor JW. Low-flow cardiopulmonary bypass produces greater pulmonary dysfunction than circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:1284-8.
85. Lange MS, Johnston MV, Tseng EE, Baumgartner WA, Blue ME. Apoptosis detection in brain using low-magnification dark-field microscopy. *Exp Neurol.* 1999;158:254-60.
86. Shin'oka T, Nagashima M, Nollert G, Shum-Tim D, Laussen PC, Lidov HG, du Plessis A, Jonas RA. A novel sialyl Lewis X analog attenuates cerebral injury after deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:1204-11.
87. Fessatidis IT, Thomas VL, Shore DF, Hunt RH, Weller RO. Neuropathological features of profoundly hypothermic circulatory arrest: an experimental study in the pig. *Cardiovasc Surg.* 1993;1:155-60.
88. Kurth CD, Priestley M, Golden J, McCann J, Raghupathi R. Regional patterns of neuronal death after deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;118:1068-77.

89. Undar A, Henderson N, Thurston GB, Masai T, Beyer EA, Frazier OH, Fraser CD, Jr. The effects of pulsatile versus nonpulsatile perfusion on blood viscoelasticity before and after deep hypothermic circulatory arrest in a neonatal piglet model. *Artif Organs*. 1999;23:717-21.
90. Esmailian F, Dox H, Sadeghi A, Eghbali K, Laks H. Retrograde cerebral perfusion as an adjunct to prolonged hypothermic circulatory arrest. *Chest*. 1999;116:887-91.
91. Langley SM, Chai PJ, Miller SE, Mault JR, Jagers JJ, Tsui SS, Lodge AJ, Lefurgey A, Ungerleider RM. Intermittent perfusion protects the brain during deep hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:4-12; discussion 12-3.
92. Tsui SS, Kirshbom PM, Davies MJ, Jacobs MT, Greeley WJ, Kern FH, Gaynor JW, Ungerleider RM. Nitric oxide production affects cerebral perfusion and metabolism after deep hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg*. 1996;61:1699-707.
93. Nollert G, Jonas RA, Reichart B. Optimizing cerebral oxygenation during cardiac surgery: a review of experimental and clinical investigations with near infrared spectrophotometry. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;48:247-53.
94. Kin H, Ishibashi K, Nitatori T, Kawazoe K. Hippocampal neuronal death following deep hypothermic circulatory arrest in dogs: involvement of apoptosis. *Cardiovasc Surg*. 1999;7:558-64.
95. Fessatidis IT, Thomas VL, Shore DF, Sedgwick ME, Hunt RH, Weller RO. Brain damage after profoundly hypothermic circulatory arrest: correlations between neurophysiologic and neuropathologic findings. An experimental study in vertebrates. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993;106:32-41.
96. Nomura F, Forbess JM, Jonas RA, Hiramatsu T, du Plessis AJ, Walter G, Stromski ME, Holtzman DH. Influence of age on cerebral recovery after deep hypothermic circulatory arrest in piglets. *Ann Thorac Surg*. 1996;62:115-22.
97. Brierley JB, Graham DI. *Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system*. 4 ed. London: Edwards Arnold; 1984.
98. Ye J, Yang L, Del Bigio MR, Filgueiras CL, Ede M, Summers R, Salerno TA, Deslauriers R. Neuronal damage after hypothermic circulatory arrest and retrograde cerebral perfusion in the pig. *Ann Thorac Surg*. 1996;61:1316-22.
99. Ye J, Yang L, Del Bigio MR, Summers R, Salerno TA, Deslauriers R. The effect of circulatory arrest and retrograde cerebral perfusion on microtubule-associated protein 2: an immunohistochemical study in pig hippocampus. *Neurosci Lett*. 1997;222:9-12.
100. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306.
101. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*. 1982;17:229-59.
102. Brown AW, Brierley JB. Anoxic-ischaemic cell change in rat brain. Light microscopic and fine-structural observations. *J. neurol.Sci*. 1972;16:59 - 84.
103. Levy DE, Brierley JB, Silverman DG, Plum F. Brief hypoxia-ischemia initially damages cerebral neurons. *Arch. Neurol*. 1975;32:450 - 456.
104. Brown AW, Brierly JB. Structural abnormalities in neurones. *J. of clinical Pathology*. 1977;30, suppl.11:155 - 169.
105. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.
106. Lo ea. Apoptosis in nervous system. *Arch Histo Cytol*. 1995??
107. Charriaut-Marlangue C. [Apoptosis and cerebral ischemia]. *Ann Pharm Fr*. 1999;57:309-13.
108. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:980-4.

109. Columbano A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem.* 1995;58:181-90.
110. Villalba M, Bockaert J, Journot L. Concomitant induction of apoptosis and necrosis in cerebellar granule cells following serum and potassium withdrawal. *Neuroreport.* 1997;8:981-5.
111. Leist M, Nicotera P. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236:1-9.
112. Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett.* 1998;102-103:139-42.
113. Li PA, Rasquinha I, He QP, Siesjo BK, Csiszar K, Boyd CD, MacManus JP. Hyperglycemia enhances DNA fragmentation after transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21:568-76.
114. Leist M, Volbracht C, Kuhnle S, Fava E, Ferrando-May E, Nicotera P. Caspase-mediated apoptosis in neuronal excitotoxicity triggered by nitric oxide. *Mol Med.* 1997;3:750-64.
115. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Mechanisms of programmed cell death and Bcl-2 protection. *Biochem Soc Trans.* 1994;22:600-2.
116. Abdul-Khaliq H, Schubert S, Troitzsch D, Wehsack A, Böttcher W, Gutsch E, Hübler M, Schmitt B, Crausaz M, Schwaller B, Celio M, Stoltenburg-Didinger G, Blasig I, Volk H-D, Liebenthal C, Hetzer R, PE. L. Ein neonatales Schweinemodell zur Evaluierung neuroprotektiver Strategien in der Kinderherzchirurgie. *Z Herz Thorax Gefäßchir.* 2001:1-8.
117. Murkin JM. The role of CPB management in neurobehavioral outcomes after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg.* 1995;59:1308-11.
118. Fessatidis IT, Thomas VL, Shore DF, Hunt RH, Weller RO, Goodland F, Rowe D, Venetikou MV, Bloom SR. Assessment of neurological injury due to circulatory arrest during profound hypothermia. An experimental study in vertebrates. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1993;7:465-72.
119. Undar A, Vaughn WK, Calhoon JH. The effects of cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest on blood viscoelasticity and cerebral blood flow in a neonatal piglet model. *Perfusion.* 2000;15:121-8.
120. Braughler JM, Hall ED, Means ED, Waters TR, Anderson DK. Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1987;67:102-5.
121. Hall ED. Neuroprotective actions of glucocorticoid and nonglucocorticoid steroids in acute neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol.* 1993;13:415-32.
122. Liu D, McAdoo DJ. Methylprednisolone reduces excitatory amino acid release following experimental spinal cord injury. *Brain Res.* 1993;609:293-7.
123. Liu Y, Cousin JM, Hughes J, Van Damme J, Seckl JR, Haslett C, Dransfield I, Savill J, Rossi AG. Glucocorticoids promote nonphagocytic phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J Immunol.* 1999;162:3639-46.
124. Tassani P. Corticosteroids during operations using cardiopulmonary bypass. *J Clin Anesth.* 2000;12:242-7.
125. Vincent JL, Wan S, Yim AP. Steroids in cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med.* 2000;27:545-8.
126. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:9991-5.
127. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. Corticosteroids are transcriptional regulators of acute inflammation. *Trans Assoc Am Physicians.* 1992;105:25-35.

128. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 1998;94:557-72.
129. Jamshidi J, Yoshimine T, Ushio Y, Hayakawa T. Effects of glucocorticoid and chemotherapy on the peritumoral edema and astrocytic reaction in experimental brain tumor. *J Neurooncol*. 1992;12:197-204.
130. Marzatico F, Gaetani P, Buratti E, Messina AL, Ferlenga P, Rodriguez y Baena R. Effects of high-dose methylprednisolone on Na(+)-K+ ATPase and lipid peroxidation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurol Scand*. 1990;82:263-70.
131. Kim JS, Chopp M, Gautam SC. High dose methylprednisolone therapy reduces expression of JE/MCP-1 mRNA and macrophage accumulation in the ischemic rat brain. *J Neurol Sci*. 1995;128:28-35.
132. Buttini M, Mir A, Appel K, Wiederhold KH, Limonta S, Gebicke-Haerter PJ, Boddeke HW. Lipopolysaccharide induces expression of tumour necrosis factor alpha in rat brain: inhibition by methylprednisolone and by rolipram. *Br J Pharmacol*. 1997;122:1483-9.
133. Cronstein BN. Molecular mechanism of methotrexate action in inflammation. *Inflammation*. 1992;16:411-23.
134. Chaney MA, Durazo-Arvizu RA, Nikolov MP, Blakeman BP, Bakhos M. Methylprednisolone does not benefit patients undergoing coronary artery bypass grafting and early tracheal extubation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;121:561-9.
135. Abdul-Khaliq H, Schubert S, Stoltenburg-Didinger G. Neuroprotective effects of pre-treatment with systemic steroids in a neonatal piglet model of cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000;18:729-31.
136. Lodge AJ, Chai PJ, Daggett CW, Ungerleider RM, Jaggars J. Methylprednisolone reduces the inflammatory response to cardiopulmonary bypass in neonatal piglets: timing of dose is important. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999;117:515-22.
137. Andersen LW, Baek L, Thomsen BS, Rasmussen JP. Effect of methylprednisolone on endotoxemia and complement activation during cardiac surgery. *J Cardiothorac Anesth*. 1989;3:544-9.
138. Boscoe MJ, Yewdall VM, Thompson MA, Cameron JS. Complement activation during cardiopulmonary bypass: quantitative study of effects of methylprednisolone and pulsatile flow. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;287:1747-50.
139. Karlstad MD, Patteson SK, Guszczka JA, Langdon R, Chesney JT. Methylprednisolone does not influence endotoxin translocation during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1993;7:23-7.
140. Barrington KJ. The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs. *BMC Pediatr*. 2001;1:1.
141. Bamberger CM, HM S. Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide. *Internist (Berlin)*. 1997;38.
142. Hohfeld J, Jentsch S. GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *Embo J*. 1997;16:6209-16.
143. Lowy MT. Quantification of type I and II adrenal steroid receptors in neuronal, lymphoid and pituitary tissues. *Brain Res*. 1989;503:191-7.
144. Sanchez MM, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR. Distribution of corticosteroid receptors in the rhesus brain: relative absence of glucocorticoid receptors in the hippocampal formation. *J Neurosci*. 2000;20:4657-68.
145. Moutsatsou P, Psarra AM, Tsiapara A, Paraskevaku H, Davaris P, Sekeris CE. Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 2001;386:69-78.
146. Zilliacus. 1994.

147. Jöels M. Steroid hormones and excitability in the mammalian brain. *Frontiers Neuroendocrinol.* 1997;18:2-48.
148. Hofmann TG, Hehner SP, Bacher S, Droge W, Schmitz ML. Various glucocorticoids differ in their ability to induce gene expression, apoptosis and to repress NF-kappaB-dependent transcription. *FEBS Lett.* 1998;441:441-6.
149. Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol.* 1996;140:43-52.
150. Almeida OF, Conde GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, Meyer M, Holsboer F, Michaelidis TM. Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *Faseb J.* 2000;14:779-90.
151. Wong PC, Barlow CF, Hickey PR, Jonas RA, Castaneda AR, Farrell DM, Lock JE, Wessel DL. Factors associated with choreoathetosis after cardiopulmonary bypass in children with congenital heart disease. *Circulation.* 1992;86:II118-26.
152. Ye J, Ryner LN, Kozlowski P, Yang L, Del Bigio MR, Sun J, Donnelly M, Summers R, Salerno TA, Somorjai RL, Saunders JK, Deslauriers R. Retrograde cerebral perfusion results in flow distribution abnormalities and neuronal damage. A magnetic resonance imaging and histopathological study in pigs. *Circulation.* 1998;98:II313-8.
153. Gross DR. Animal model in Cardiovascular Research. In: *Martinus Nijhoff Publication.* Boston; 1985.
154. Somogyi P, Tagaki H. A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience.* 1982;7:1779 - 1783.
155. Cammermeyer J. Nonspecific changes of the central nervous system in normal and experimental material. In: *The structure and function of nervous tissue.* New York, London: Academic Press; 1972:131-251.
156. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem-Cytochem.* 1984;32:219-29.
157. Hulette CM, Downey BT, Burger PC. Macrophage markers in diagnostic neuropathology. *Am J Surg Pathol.* 1992;16:493-9.
158. Brock MV, Blue ME, Lowenstein CJ, Northington FA, Lange MS, Johnston MV, Baumgartner WA. Induction of neuronal nitric oxide after hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:1313-20.
159. Brucher JM, Musoglu E, Bangels M. Morphometry and electronic data processing. *Clinical Neuropathol.* 1986;5:122-123.
160. Nollert G, Nagashima M, Bucerius J, Shin'oka T, Jonas RA. Oxygenation strategy and neurologic damage after deep hypothermic circulatory arrest. I. Gaseous microemboli. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:1166-71.
161. Bokesch PM, Seirafi PA, Warner KG, Marchand JE, Kream RM, Trapp B. Differential immediate-early gene expression in ovine brain after cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest. *Anesthesiology.* 1998;89:961-8.
162. Vejlsted H, Andersen K, Fischer Hansen B, Husum B, Arnbjerg J. Myocardial preservation during anoxic arrest. Premedication with propranolol, verapamil or methylprednisolone. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983;17:269-76.
163. Uhler TA, Frim DM, Pakzaban P, Isacson O. The effects of megadose methylprednisolone and U-78517F on toxicity mediated by glutamate receptors in the rat neostriatum. *Neurosurgery.* 1994;34:122-7; discussion 127-8.

164. Joels M, Vreugdenhil E. Corticosteroids in the brain. Cellular and molecular actions. *Mol Neurobiol.* 1998;17:87-108.
165. Xu J, Fan G, Chen S, Wu Y, Xu XM, Hsu CY. Methylprednisolone inhibition of TNF- α expression and NF- κ B activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;59:135-42.
166. Simard M, Couldwell WT, Zhang W, Song H, Liu S, Cotrina ML, Goldman S, Nedergaard M. Glucocorticoids-potent modulators of astrocytic calcium signaling. *Glia.* 1999;28:1-12.
167. Tsubota S, Adachi N, Chen J, Yorozuya T, Nagaro T, Arai T. Dexamethasone changes brain monoamine metabolism and aggravates ischemic neuronal damage in rats. *Anesthesiology.* 1999;90:515-23.
168. Sapolsky RM. Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol.* 1999;34:721-32.
169. Bremer AM, Yamada K, West CR. Ischemic cerebral edema in primates: effects of acetazolamide, phenytoin, sorbitol, dexamethasone, and methylprednisolone on brain water and electrolytes. *Neurosurgery.* 1980;6:149-54.
170. Koide T, Wieloch TW, Siesjo BK. Chronic dexamethasone pretreatment aggravates ischemic neuronal necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1986;6:395-404.
171. Hall ED, Braughler JM, McCall JM. Antioxidant effects in brain and spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 1992;9 Suppl 1:S165-72.
172. Adachi N, Chen J, Liu K, Tsubota S, Arai T. Dexamethasone aggravates ischemia-induced neuronal damage by facilitating the onset of anoxic depolarization and the increase in the intracellular Ca^{2+} concentration in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:274-80.
173. Wan S, LeClerc JL, Huynh CH, Schmartz D, DeSmet JM, Yim AP, Vincent JL. Does steroid pretreatment increase endotoxin release during clinical cardiopulmonary bypass? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:1004-8.
174. Chaney MA, Nikolov MP, Blakeman BP, Bakhos M, Slogoff S. Hemodynamic effects of methylprednisolone in patients undergoing cardiac operation and early extubation. *Ann Thorac Surg.* 1999;67:1006-11.
175. Laursen H, Waaben J, Gefke K, Husum B, Andersen LI, Sorensen HR. Brain histology, blood-brain barrier and brain water after normothermic and hypothermic cardiopulmonary bypass in pigs. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1989;3:539-43.
176. Chen CJ, Liao SL, Kuo JS. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J Neurochem.* 2000;75:1557-65.
177. Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Ronnback L. Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int.* 2000;37:317-29.
178. Bender AS, Young LP, Norenberg MD. Effect of lactic acid on L-glutamate uptake in cultured astrocytes: mechanistic considerations. *Brain Res.* 1997;750:59-66.
179. Plesnila N, Muller E, Ringel F, Peters J, Baethmann A. Glial cell swelling--effect of hypothermia. *Acta Neurochir Suppl.* 1999;73:63-6.
180. Bissonnette B, Pellerin L, Ravussin P, Daven VB, Magistretti PJ. Deep hypothermia and rewarming alters glutamate levels and glycogen content in cultured astrocytes. *Anesthesiology.* 1999;91:1763-9.
181. Walz W, Klimaszewski A, Paterson IA. Glial swelling in ischemia: a hypothesis. *Dev Neurosci.* 1993;15:216-25.
182. Plesnila N, Muller E, Guretzki S, Ringel F, Staub F, Baethmann A. Effect of hypothermia on the volume of rat glial cells. *J Physiol.* 2000;523 Pt 1:155-62.

183. Nollert G, Nagashima M, Bucerius J, Shin'oka T, Lidov HG, du Plessis A, Jonas RA. Oxygenation strategy and neurologic damage after deep hypothermic circulatory arrest. II. hypoxic versus free radical injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;117:1172-9.
184. Shum-Tim D, Nagashima M, Shinoka T, Bucerius J, Nollert G, Lidov HG, du Plessis A, Laussen PC, Jonas RA. Postischemic hyperthermia exacerbates neurologic injury after deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;116:780-92.
185. Forbess JM, Ibla JC, Lidov HG, Cioffi MA, Hiramatsu T, Laussen P, Miura T, Jonas RA. University of Wisconsin cerebroplegia in a piglet survival model of circulatory arrest. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:S494-500.
186. Li PA, Kristian T, Shamloo M, Siesjo K. Effects of preischemic hyperglycemia on brain damage incurred by rats subjected to 2.5 or 5 minutes of forebrain ischemia. *Stroke.* 1996;27:1592-601; discussion 1601-2.
187. Sato K, Matsuki N. A 72 kDa heat shock protein is protective against the selective vulnerability of CA1 neurons and is essential for the tolerance exhibited by CA3 neurons in the hippocampus. *Neuroscience.* 2002;109:745-56.
188. Yue X, Mehmet, J.P., Cooper, C., Cady, E., Wyatt, J.S., Reynolds, E.O.R., Edwards, A.D., Squier, M.V. Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 1997;23:16-25.
189. Nicotera P, Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium.* 1998;23:173-80.
190. Ahlbom E, Gogvadze V, Chen M, Celsi G, Ceccatelli S. Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:14726-30.
191. Reagan LP, Mc Ewens BS. Controverses surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat.* 1997;13:149 - 167.
192. Muijsce DJ, Towfighi J, Yager JY, Vannucci RC. Neuropathologic aspects of hypothermic circulatory arrest in newborn dogs. *Acta Neuropathol.* 1993;85:190-8.
193. Kerr JF. Shrinkage necrosis of adrenal cortical cells. *J Pathol.* 1972;107:217-9.
194. Leist M, Nicotera P. Apoptosis versus necrosis: the shape of neuronal cell death. *Results Probl Cell Differ.* 1998;24:105-35.
195. Yuan J., BA Y. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000;407:802-9.
196. Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, Hamilton RL, Loeffert JE, Graham SH. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *Faseb J.* 1999;13:813-21.
197. Thompson MA, Broadbent MP. Methylprednisolone prior to cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia.* 1980;35:345-53.
198. Hicks GL, Hill AA, DeWeese JA. Subendocardial protection during cardiopulmonary bypass. Its use with methylprednisolone and glucose-insulin-potassium. *Arch Surg.* 1979;114:302-4.
199. Kanellopoulos GK, Kato H, Wu Y, Dougenis D, Mackey M, Hsu CY, Kouchoukos NT. Neuronal cell death in the ischemic spinal cord: the effect of methylprednisolone. *Ann Thorac Surg.* 1997;64:1279-85; discussion 1286.
200. Chen A, Xu XM, Kleitman N, Bunge MB. Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol.* 1996;138:261-76.
201. Fosse E, Mollnes TE, Osterud A, Aasen AO. Effects of methylprednisolone on complement activation and leukocyte counts during cardiopulmonary bypass. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg.* 1987;21:255-61.

202. Koszdin KL, Shen DD, Bernards CM. Spinal cord bioavailability of methylprednisolone after intravenous and intrathecal administration: the role of P-glycoprotein. *Anesthesiology*. 2000;92:156-63.
203. Abram SE, Marsala M, Yaksh TL. Analgesic and neurotoxic effects of intrathecal corticosteroids in rats. *Anesthesiology*. 1994;81:1198-205.
204. Dougherty JH, Fraser RAR. Complications following intraspinal injections of steroids. *J. Neurosurg*. 1978;48:1023-1025.
205. Berndt S, Fuhrmeister U. *Glukokortikoide (Pharmakotherapie der Blut-Liquor-Schranke)*. Stuttgart: Thieme; 1980.
206. Lehrer GM, Maker HS, Weisbarth S. Brain uptake of methylprednisolone acetate from cerebrospinal fluid and systemic sites. *Arch. Neurol. (chic.)*. 1973;28:324-328.
207. Chen TC, Mackic JB, McComb JG, Giannotta SL, Weiss MH, Zlokovic BV. Cellular uptake and transport of methylprednisolone at the blood-brain barrier. *Neurosurgery*. 1996;38:348-54.
208. Uete T, Nishimura S, Ohya H. Corticosteroid levels in blood and cerebrospinal fluid in various diseases. *J. clin. Endocr.* 1978;30:208-214.
209. Shegal AD, Tweed AC, Gardner WJ. Laboratory studies after intrathecal corticoids. Determination of corticosteroids in plasma and CSF. *Arch. Neurol.* 1963;9:64-68.
210. Abdul-Khaliq H, Troitzsch D, Berger F, Lange PE. [Regional transcranial oximetry with near infrared spectroscopy (NIRS) in comparison with measuring oxygen saturation in the jugular bulb in infants and children for monitoring cerebral oxygenation]. *Biomed Tech (Berl)*. 2000;45:328-32.
211. Husum B, Palm T, Andersen K, Vejlsted H. Immediate hemodynamic effect of pharmacological doses of methylprednisolone in dogs, and the influence of speed of injection. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1980;24:61-4.
212. Dietzman RH, Lunseth JB, Goott B, Berger EC. The use of methylprednisolone during cardiopulmonary bypass. A review of 427 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1975;69:870-3.
213. Jonas RA. Myocardial protection for neonates and infants. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;46 Suppl 2:288-91.
214. Mount LE, Ingram, D.L. *The Pig as a Laboratory Model*. New York: Academic Press; 1971.
215. Pond WG, Houpt, K.A. The Biology of the Pig. In. Ithaca, NY: Cornell University Press; 1978.
216. Chaney MA, Nikolov MP, Blakeman B, Bakhos M, Slogoff S. Pulmonary effects of methylprednisolone in patients undergoing coronary artery bypass grafting and early tracheal extubation [see comments]. *Anesth Analg*. 1998;87:27-33.
217. Griep EB, Griep RB. Cerebral consequences of hypothermic circulatory arrest in adults. *J Card Surg*. 1992;7:134-55.
218. Cherian L, Goodman JC, Robertson CS. Hyperglycemia increases brain injury caused by secondary ischemia after cortical impact injury in rats. *Crit Care Med*. 1997;25:1378-83.
219. Vannucci RC, Rossini A, Towfighi J. Effect of hyperglycemia on ischemic brain damage during hypothermic circulatory arrest in newborn dogs. *Pediatr Res*. 1996;40:177-84.
220. Kondo F, Kondo Y, Makino H, Ogawa N. Delayed neuronal death in hippocampal CA1 pyramidal neurons after forebrain ischemia in hyperglycemic gerbils: amelioration by indomethacin. *Brain Res*. 2000;853:93-8.
221. Kawai N, Keep RF, Betz AL, Nagao S. Hyperglycemia induces progressive changes in the cerebral microvasculature and blood-brain barrier transport during focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl*. 1998;71:219-21.

222. Anderson RV, Siegman MG, Balaban RS, Ceckler TL, Swain JA. Hyperglycemia increases cerebral intracellular acidosis during circulatory arrest [published erratum appears in *Ann Thorac Surg* 1993 Apr;55(4):1054]. *Ann Thorac Surg*. 1992;54:1126-30.
223. Siesjo BK, Katsura KI, Kristian T, Li PA, Siesjo P. Molecular mechanisms of acidosis-mediated damage. *Acta Neurochir Suppl*. 1996;66:8-14.
224. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis*. 1999;6:347-63.
225. Rosenberg LJ, Jordan RS, Gross GW, Emery DG, Lucas JH. Effects of methylprednisolone on lesioned and uninjured mammalian spinal neurons: viability, ultrastructure, and network electrophysiology. *J Neurotrauma*. 1996;13:417-37.
226. Karst H, Karten YJ, Reichardt HM, de Kloet ER, Schutz G, Joels M. Corticosteroid actions in hippocampus require DNA binding of glucocorticoid receptor homodimers. *Nat Neurosci*. 2000;3:977-8.
227. Joels M. Corticosteroid actions in the hippocampus. *J Neuroendocrinol*. 2001;13:657-69.
228. Siesjo BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjo P, Katsura K, Folbergrova J. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann Thorac Surg*. 1995;59:1316-20.
229. Kristian T, Siesjo BK. Calcium-related damage in ischemia. *Life Sci*. 1996;59:357-67.
230. Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke*. 1998;29:705-18.
231. Leist M, Nicotera P. Calcium and neuronal death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1998;132:79-125.
232. Sapolsky R, Pulsinelli WA. Glucocorticoids potentiate ischemic damage to brain. *Ann Neurol*. 1985;18:125.
233. Pfaff DW, Silva M, Weiss JM. Telemetered recording of hormone effects on hippocampal neurons. *Science*. 1971;171:394-395.
234. Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK, Cox JW, Anderson DK. Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 1992;9 Suppl 2:S425-42.
235. Hall ED. Lipid antioxidants in acute central nervous system injury. *Ann Emerg Med*. 1993;22:1022-7.
236. Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass: lessons learned from cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1997;63:269-76.
237. Si QS, Nakamura Y, Kataoka K. Hypothermic suppression of microglial activation in culture: inhibition of cell proliferation and production of nitric oxide and superoxide. *Neuroscience*. 1997;81:223-9.
238. Osuka K, Suzuki Y, Saito K, Takayasu M, Shibuya M. Changes in serum cytokine concentrations after neurosurgical procedures. *Acta Neurochir*. 1996;138:970-6.
239. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980;284:555-6.
240. Chandra J, Gilbreath J, Freireich EJ, Kliche KO, Andreeff M, Keating M, McConkey DJ. Protease activation is required for glucocorticoid-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood*. 1997;90:3673-81.
241. Hicsonmez G, Erdemli E, Tekelioglu M, Tuncer AM, Ozbek N, Cetin M, Cotter TG. Morphologic evidence of apoptosis in childhood acute myeloblastic leukemia treated with high-dose methylprednisolone. *Leuk Lymphoma*. 1996;22:91-6, follow. 186, color plate VII-III.
242. Schmidt J, Gold R, Schonrock L, Zetl UK, Hartung HP, Toyka KV. T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain*. 2000;123:1431-41.

243. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3:839-43.
244. Guzhova I, Kislyakova K, Moskaliova O, Fridlanskaya I, Tytell M, Cheetham M, Margulis B. In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance. *Brain Res.* 2001;914:66-73.
245. Foster JA, Brown IR. Intracellular localization of heat shock mRNAs (hsc70 and hsp70) to neural cell bodies and processes in the control and hyperthermic rabbit brain. *J Neurosci Res.* 1996;46:652-65.
246. Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K. [Correlation between induction of ischemic tolerance and expression of heat shock protein-70 in the rat hippocampus]. *No To Shinkei.* 1993;45:157-62.
247. Reshef A, Capua ND, Sperling O, Zoref-Shani E. Ischemic tolerance conferred to cultured rat neurons by heat shock is not mediated by opening of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Neurosci Lett.* 2000;287:223-6.
248. Kitamura Y, Shimohama S, Kamoshima W, Ota T, Matsuoka Y, Nomura Y, Smith MA, Perry G, Whitehouse PJ, Taniguchi T. Alteration of proteins regulating apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak, Bad, ICH-1 and CPP32, in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1998;780:260-9.
249. Parsadanian AS, Cheng Y, Keller-Peck CR, Holtzman DM, Snider WD. Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons. *J Neurosci.* 1998;18:1009-19.
250. Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.* 2000;12:611-20.
251. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 1998;254:439-59.
252. Putcha GV, Harris CA, Moulder KL, Easton RM, Thompson CB, Johnson EM, Jr. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. *J Cell Biol.* 2002;157:441-53.

Anhang

Lebenslauf

Stephan Nicolas Schubert, geb. am 15. November 1974 in Bremen.

SCHULBILDUNG

1981-1994 ABITUR AM ALTEN GYMNASIUM, BREMEN

ZIVILDIENTST

1994-1995 RETTUNGSDIENST IM DEUTSCHEN ROTEN KREUZ, BREMEN

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

1995-1997 VORKLINIK, MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT, HALLE

1997-2001 KLINISCHE AUSBILDUNG AN DER FREIEN UNIVERSITÄT, BERLIN

MEDIZINISCHE PRAKTIKA/ FAMULATUREN

1996 NOTFALLMEDIZIN IM ZKH ST. JÜRGEN-STRASSE, BREMEN

1997 PÄDIATRIE IN DER PROF. HESS KINDERKLINIK, BREMEN

1998 CHIRURGIE IM AUGUSTE-VIKTORIA-KRANKENHAUS, BERLIN

1999 INNERE MEDIZIN/ KARDIOLOGIE IM DT. HERZZENTRUM BERLIN

04/2000 KINDERKARDIOLOGIE IM DT. HERZZENTRUM (DHZB), BERLIN

08/2000 ANÄSTHESIE MOUNT SINAI MEDICAL SCHOOL NEW YORK, USA

09/2000 HERZCHIRURGIE MOUNT SINAI MEDICAL SCHOOL N.Y., USA

ZUSÄTZLICHE AKTIVITÄTEN

1997-2003 RETTUNGSSANITÄTER IM DEUTSCHEN ROTEN KREUZ, BREMEN

1998-2003 WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT KINDERKARDIOLOGIE DHZB.

PRAKTISCHES JAHR

04-07/2001 CHIRURGIE AM AUGUSTE-VIKTORIA-KRANKENHAUS, BERLIN

07-09/2001 INNERE MEDIZIN, UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIEN

10-11/2001 INTERNISTISCHE INTENSIVMEDIZIN/ NEPHROLOGIE, UNIVERSITY OF CHICAGO, USA

11–12/2001 KINDERKARD. CHILDREN'S HOSPITAL, UNIV. OF CHICAGO, USA

01–04/2002 PÄDIATRIE AM OHZ FÜR KINDERHEILKUNDE, CHARITÉ, BERLIN

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

SEIT MAI 2002 ARZT IM PRAKTIKUM IN DER ABT. FÜR KINDERKARDIOLOGIE
UND AHF IM DHZB

Publikationen

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Stoltenburg-Didinger G. Neuroprotective effects of pre-treatment with systemic steroids in a neonatal piglet model of cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;18(6):729-730.

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Fischer T, Böttcher W, Harke C, Alexi-Meskishvili V, Lange PE, Blasig E. The effect of continuous treatment with sodium nitroprusside on the serum kinetics of the brain marker protein S-100 β in neonates undergoing corrective cardiac surgery by means of hypothermic cardiopulmonary bypass. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(11):1173-1175.

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Stoltenburg-Didinger G, Troitzsch D, Böttcher W, Hübler M, Meißler M, Große-Siestrup C, Alexi-Meskishvili V, Hetzer R, Lange PE. Protein S-100 β in brain and serum after deep hypothermic circulatory arrest in rabbits: relationship to perivascular astrocytic swelling. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(11):1169-1172.

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Troitzsch D, Huebler M, Boettcher W, Baur MO, Lange PE. Dynamic changes in cerebral oxygenation related to deep hypothermia and circulatory arrest evaluated by near-infrared spectroscopy. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2001 Jul;45(6):696-701.

Hashim Abdul-Khaliq, **Stephan Schubert**, Gisela Stoltenburg-Didinger, Michael Huebler, Dirk Troitzsch, Anke Wehsack, Wolfgang Boettcher, Beat Schwaller, Michel Crausaz, Marco Celio, Matthias L. Schröter, Ingolf E. Blasig, Roland Hetzer, Peter E. Lange. Release patterns of astrocytic and neuronal biochemical markers in serum during and after experimental settings of cardiac surgery. *Restorative Neurology and Neuroscience* 2003 (Im Druck)

Abdul-Khaliq H, Troitzsch D, **Schubert S**, Wehsack A, Böttcher W, Hübler M, Hetzer R, Lange PE. Evaluierung neuroprotektiver Strategien an einem neonatalen Schweinemodell einer extrakorporalen Zirkulation mit Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie. *Z Herz Thorax Gefäßschir* 2001;15(6):253-260

Abdul-Khaliq H, Troitzsch D, **Schubert S**, Wehsack A, Boettcher W, Gutsch E, Hubler M, Hetzer R, Lange PE. Cerebral oxygen monitoring during neonatal cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2002 Apr;50(2):77-81.

Schubert S, Abdul-Khaliq H, Stoltenburg-Didinger G, Troitzsch D, Böttcher W, Hübler M, Alexi Meskishvili V, Hetzer R, Lange PE. Time-dependend Neuroprotective Effect of Deep hypothermic circulatory arrest (DHCA). *Pediatr. Res*. 2003 (eingereicht)

Schubert S, Abdul-Khaliq H, Stoltenburg-Didinger G, Troitzsch D, Böttcher W, Lange PE. Intrathecal Pretreatment with Methylprednisolone showed a Neuroprotective Effect in a Neonatal Piglet Model of Cardiopulmonary Bypass with Deep Hypothermic Circulatory Arrest.. *Stroke* 2003 (eingereicht)

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Stoltenburg-Didinger G, Troitzsch D, Böttcher W, Hübler M, Meißler M, Große-Siestrup C, Alexi-Meskishvili V, Hetzer R, Lange PE. Systemic Pretreatment with Methylprednisolone is not Neuroprotective in a Neonatal Piglet Model of cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest. *Ann Thorac Surg* 2003 (eingereicht)

Kurzfassungen

Schubert S, Abdul-Khaliq H, Stoltenburg-Didinger G, Troitzsch D, Wehsack A, Kanaan M, Jäckel B, Böttcher W, Lange PE. Auswirkungen der Vorbehandlung mit Steroiden auf die zerebrale Perfusion und die Hirnmorphologie nach Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie – Eine experimentelle Untersuchung. 50. Jahrestagung der Norddeutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde, Potsdam 2001, *Kongressband*. (Ausgezeichnet mit dem 1 Posterpreis)

S. Schubert, H. Abdul-Khaliq, M Hübler, W Böttcher, M-O.Baur, G. Stoltenburg-Didinger, D.Troitzsch, V. Alexi-Meskishvili, M. Kopitz, H Kuppe, R. Hetzer, P.E. Lange: Der Effekt von Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie auf die intravaskuläre und intrazelluläre Oxygenation im Gehirn von Kaninchen. Norddeutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin 14-16 Mai 1999, Bremen, *Kongreßband*, ISBN: 3-931310-23-X

S. Schubert, H. Abdul-Khaliq, G. Stoltenburg-Didinger, M.Hübler, W.Böttcher, MO.Baur, D.Troitzsch, R. Hetzer, P.E. Lange: Zusammenhang zwischen erhöhten S-100 Serumwerten und immunhistochemischen Nachweis im Gehirn nach Kreislaufstillstand mit tiefer Hypothermie beim Kaninchen. Norddeutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin 14-16 Mai 1999, Bremen, *Kongreßband*, ISBN : 3-931310-23-X

S. Schubert, H. Abdul-Khaliq, G. Stoltenburg-Didinger, M. Hübler, W. Böttcher, MO. Baur, D. Troitzsch, V. Alexi-Meskishvili, R. Hetzer, P.E. Lange: Zusammenhang zwischen erhöhten S-100 Serumwerten und immunhistochemischen Expression im Gehirn nach Kreislaufstillstand mit tiefer Hypothermie beim Kaninchen. 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie, Wuppertal, 2-5.10.1999. *Z Kardiologie* 1999;88:761.

S. Schubert, H. Abdul-Khaliq, M Hübler, W Böttcher, D.Troitzsch, H Kuppe, G.Stolteburg-Didinger, R. Hetzer, P.E. Lange: Der Effekt von Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie auf die zerebrale Oxygenation in einem neugeborenen Schweinemodell. 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie, Wuppertal, 2-5.10.1999. *Z Kardiologie* 1999;88:762

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Hübler M, Troitzsch D, Böttcher W, Alexi-Meskishvili V, Kopitz M, Kuppe H, Hetzer R, Lange PE. Early immunohistochemical brain overexpression of S-100 β and increased serum level after deep hypothermic circulatory arrest in rabbits: relationship to perivascular astrocytic swelling. International symposium on the pathophysiology of cardiopulmonary bypass. Aachen Dezember 3, 1999 (*Abstractband*) (Ausgezeichnet mit dem 1 Posterpreis)

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Hübler M, Stoltenburg-Didinger G, Böttcher W, Baur MO, Troitzsch D, Alexi-Meskishvili V, Kopitz M, Kuppe H, Hetzer R, Lange PE. Effect of profound hypothermic circulatory arrest on cerebral mitochondrial and regional haemoglobin saturation in rabbits. 24th World Congress of the International Society for Cardiovascular Surgery, Melbourne, 12.-17.9.1999. *Cardiovasc Surg* 1999;6 (Suppl):67.

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Alexi-Meskishvili V, Blasig IE, Lange PE. Possible neuroprotective effect of non liberator sodium nitroprusside treatment in infants and children after corective cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. 35th Annual General Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology, Straßburg, 14.-17.6.2000. *Cardiol Young* 2000;10 (Suppl 2):28.

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Stoltenburg-Didinger G, Celio M, Troitzsch D, Hübler M, Böttcher W, Hetzer R, Lange. PE. Mode of brain cell injury after cardiopulmonary bypass and hypothermic circulatory arrest in rabbits: relationship to biochemical brain marker in serum. 22nd Congress of the European Society of Cardiology, Amsterdam, 26.-30.8.2000. *Eur Heart J* 2000; 21(Abtract-Suppl):49.

Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Stoltenburg-Didinger G, Hübler M, Troitzsch D, Böttcher W, Gutsch E, Harke C, Kopitz M, Hetzer R, Lange PE. Brain injury after deep hypothermic circulatory arrest in neonatal piglets. Astroglial cell injury precede neuronal injury. 35th Annual General Meeting of the Association for European Paediatric Cardiology, Straßburg, 14.-17.6.2000. *Cardiol Young* 2000;10 (Suppl 2):27-28.

Abdul-Khaliq H, Hübler M, **Schubert S**, Troitzsch D, Böttcher W, Alexi-Meskishvili V, Kopitz M, Kuppe H, Hetzer R, Lange PE. Cerebral mitochondrial and intravascular oxygenation patterns during and after profound hypothermic circulatory arrest in rabbits. *Critical Care* 2000;4(2):138-139

Troitzsch D, Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Wehsack A, Böttcher W, Hübler M, Hetzer R, Lange PE. Dynamic changes in brain oxygenation during cardiopulmonary bypass and circulatory arrest in newborn piglets evaluated in vivo near-infrared spectroscopy. 30th Annual Meeting of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery, Leipzig, *Thorac Cardiovasc Surg* 2001;49 (Suppl 1):27.

Abdul-Khaliq H, Troitzsch D, Wehsack A, **Schubert S**, Böttcher W, Gutsch E, Hübler M, Hetzer R, Lange PE. Effects of high-dose methylprednisolone on neonatal pulmonary function after cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest. 3rd International Symposium on the Pathophysiology of Cardiopulmonary Bypass – Myocardial Cell Damage and Myocardial Protection, Aachen, 16.12.2000. *Critical Care* 2001;5:107

Stoltenburg-Didinger G, Finkeldey H, Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Lange PE. Neuropathologische Analyse von Hirnveränderungen bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern. 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie, Berlin, 7.-10.10.2000. *Z Kardiologie* 2000;89:848.

Wehsack A, Abdul-Khaliq H, **Schubert S**, Troitzsch D, Böttcher W, Liebenthal C, Volk HD, Hetzer R, Lange PE. Produktion von Interleukin-8 (IL-8) und TNF- α im Serum und bronchoalveolärer Lavage (BAL) nach tief-hypothermem Kreislaufstillstand (THKS). Einfluß der Vorbehandlung mit Methylprednisolon. 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie, Berlin, 7.-10.10.2000. *Z Kardiologie* 2000;89:862.

Danksagung

Ich danke meiner gesamten Familie für die Unterstützung und Hilfe während meiner gesamten Ausbildung.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Privatdozent Dr. Hashim Abdul-Khaliq, von dem ich nicht nur das wissenschaftliche Arbeiten gelernt habe, sondern der mich mit seiner Begeisterung und seinem Enthusiasmus für Forschung und Lehre stets motiviert und weitergebracht hat – unsere Zusammenarbeit war einmalig!

Besonderer Dank gilt ebenfalls meinem geschätzten Chef, Herrn Prof. Dr. Peter E. Lange, Chef der Abteilung für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler im Deutschen Herzzentrum Berlin, der mir die Möglichkeit dieser Promotion gegeben hat und mich kontinuierlich bei meiner Arbeit in seiner Abteilung begleitet hat. Seine Unterstützung war außerordentlich wertvoll und hat mir viel bedeutet.

Herzlicher Dank gilt weiterhin Frau Prof. Dr. med. Gisela Stoltenburg-Didinger und den Mitarbeitern in der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin. Ohne die Unterstützung des gesamten Teams dort hätte diese Arbeit nicht zustande kommen können.

Zusätzlich danke ich allen, die an den sehr aufwendigen Versuchen direkt oder indirekt beteiligt waren. Dabei sind namentlich zu erwähnen: Wolfgang Böttcher, meine beiden Kollegen und Mitdoktoranden Anke Wehsack und Dirk Troitzsch, Dr. med. vet. Michael Meissler und die Mitarbeiter in der tierexperimentellen Einheit der Charité, sowie Thore Dittrich und Boris Schmidt.

Eidestattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Diese Arbeit stellt, auch in Teilen, keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel und die Literatur sind vollständig angegeben.

Stephan Schubert